

UNIVERZITA KARLOVA

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA BIOFYZIKY A FYZIKÁLNÍ CHEMIE



BAKALÁRSKA PRÁCA

**BIOLOGICKÉ MEMBRÁNY A TRANSPORT LÁTKOK
V ORGANIZME**

SILVIA HEGLASOVÁ

Vedúci bakalárskej práce: Mgr. Monika Kuchařová, Ph.D.

HRADEC KRÁLOVÉ, 2017

Podakovanie

Chcem sa veľmi poďakovať vedúcej mojej bakalárskej práce, pani Mgr. Monike Kuchařovej, Ph. D. za jej cenné rady a pripomienky.

„Prehlasujem, že táto práca je mojím pôvodným autorským dielom. Literatúra a ďalšie zdroje, z ktorých som pri jej spracovaní čerpala, sú uvedené v zozname použitej literatúry a v práci sú riadne citované. Práca nebola použitá k získaniu iného alebo rovnakého titulu.“

V Hradci Králové dňa

Podpis

Obsah

1.	CIEĽ PRÁCE.....	7
2.	BIOLOGICKÉ MEMBRÁNY	8
2.1	Zloženie	8
2.1.1	Glycerolfosfolipidy	8
2.1.2	Sfingolipidy	8
2.1.3	Cholesterol	9
2.1.4	Proteíny	10
2.1.5	Sacharidy	10
2.2	Štruktúra	10
2.2.1	Spontánne väzby tvoriace štruktúru membrán	11
2.2.2	Asymetria biologických membrán.....	11
2.3	Fyzikálne vlastnosti	12
2.3.1	Priepustnosť	12
2.3.2	Pohyblivosť zložiek membrány	12
2.3.3	Tekutosť membrány	13
2.4	Funkcie membrán	14
2.4.1	Udržiavanie elektrochemického gradientu	14
2.4.2	Signalizačná funkcia proteínov.....	15
2.4.3	Enzymatická aktivita.....	17
2.4.4	Membránové prenášače	18
3.	Transport látok v organizme	19
3.1	Pasívny transport	19
3.1.1	Donnanova rovnováha	19
3.1.2	Difúzia.....	19
3.1.3	Uľahčená difúzia.....	20
3.1.4	Osmóza.....	20
3.2	Aktívny transport	21
3.2.1	Príklad primárne aktívneho transportu.....	21
3.2.2	Príklad sekundárne aktívneho transportu.....	22
3.3	Transport látok v membránovom kontinuu.....	22
3.3.1	Endocytóza	22

3.3.2	Exocytóza	23
3.3.3	Transport látok vnútri bunky.....	23
4.	Kompartmenty eukaryotickej živočíšnej bunky	24
4.1	Jadro	24
4.2	Endoplazmatické retikulum (ER)	24
4.3	Golgiho aparát (GA).....	25
4.4	Mitochondrie	25
5.	Metódy využívané pre štúdium membrán	26
5.1	Mikroskopia atómových síl	26
5.2	Počítačová mikroskopia	29
5.2.1	Molekulárna dynamika	29
6.	Využitie biologických membrán pre terapiu chorôb	31
6.1	Lipozómy v terapii	31
6.2	Extracelulárne vezikuly (EV)	32
6.2.1	Fyziologická a patofyziologická funkcia EV.....	33
6.2.2	Zmena fenotypu bunky po prenose informácie mikrovezikulami	33
6.2.3	Extracelulárne vezikuly v terapii	34
6.3	Tvorba pórov v membráne.....	34
6.3.1	Tvorba pórov v membráne navodená antimikrobiálnymi peptidmi.....	35
6.3.2	Tvorba pórov v membráne navodená fosfolipidmi.....	36
6.3.3	Význam tvorby pórov v membránach	36
7.	Využitie intracelulárneho transportu pre cielenú terapiu	37
7.1	Spôsoby vniknutia látky do bunkových kompartmentov.....	37
7.2	Použitie receptormi sprostredkovanej endocytózy	38
7.2.1	Transport liečiva do lyzozómov.....	39
7.2.2	Transport liečiva do hyaloplazmy.....	39
8.	Význam raftových domén	40
9.	Membrány a choroby	41
9.1	Alzheimerova choroba	41
9.2	Význam kardiolípinu pri vzniku Parkinsonovej choroby	43

10. ZÁVER	46
11. POUŽITÉ SKRATKY.....	47
12. ZOZNAM OBRÁZKOV	49
13. POUŽITÁ LITERATÚRA.....	50

1. CIEĽ PRÁCE

Cieľom mojej práce je objasniť funkciu, štruktúru a význam biologických membrán pre ľudský organizmus. K tejto problematike tiež patria spôsoby prenosu látok cez membrány a popis kompartmentov.

V úvode mojej literárnej rešerše som sa zamerala na objasnenie základných pojmov týkajúcich sa biologických membrán. Pre uvedenie do danej problematiky som na úvod popísala základné lipidové, proteínové a sacharidové zložky biologických membrán. Ďalej som sa venovala štruktúre, fyzikálnym vlastnostiam a funkcii membrán. Medzi základné vlastnosti membrán patrí nielen ich schopnosť oddeľovať dva rôzne kompartmenty, ale aj selektívny prenos látok skrz ich štruktúru. Preto som v ďalšej kapitole popísala základné transportné mechanizmy, ktoré membrána využíva pre prenos látok. Významnosť membrán som názorne popísala na príkladoch niektorých bunkových kompartmentov.

V ďalšej časti práce som sa venovala metódam a možnostiam štúdia biologických membrán, pretože pomáhajú napredovať výskumu v tejto oblasti. Využitie membrán ako potencionálnych prenášačov liečiv sa v dnešnej dobe stáva významným predmetom štúdia mnohých vedcov. Zvýšením permeability membrán vytvorením pórov pomocou antimikrobiálnych peptidov je možné dokonca navodiť apoptózu bunky. Podobne aj úpravou látok využiteľných ako liečiv (DNA, rôzne peptidy atď.) môže byť ovplyvnený metabolizmus bunky. Významnú úlohu v štruktúre membrán hrajú lipidové rafty, ktoré udržiavajú identitu daného kompartmentu ohraničeného membránou.

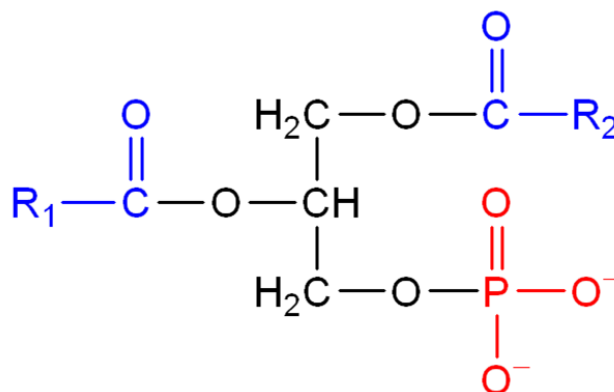
V závere práce som sa venovala významu biologických membrán z hľadiska patofyziológie neurodegeneratívnych chorôb.

2. BIOLOGICKÉ MEMBRÁNY

2.1 Zloženie

2.1.1 Glycerolfosfolipidy

Hlavnou súčasťou biologických membrán sú glycerolfosfolipidy, ktoré tvoria viac ako 50% membránových lipidov. (1) Základom týchto zlúčenín je kyselina glycerol-3-fosforečná. Na svoje voľné hydroxylové skupiny viaže acylové zbytky mastných kyselín, čím sa vytvára nepolárny charakter časti molekuly. Takto vzniká kyselina fosfatidová, ktorá na svoj fosfátový zbytok môže viazať ďalšiu molekulu nabitú kladne, záporne alebo neutrálne. Štruktúru glycerolfosfolipidu vidíme na Obrázok 1. Fosfatidylcholín má na zbytku kyseliny fosforečnej estericky viazaný cholín. Fosfatidylcholíny inak nazývame aj lecitíny. Podobne viazaný môže byť etanolamín. Vznikajú tak fosfatidyletanolamíny so starším názvom kefalíny a s podobnými vlastnosťami ako lecitíny. Ďalšie sú fosfatidylseríny, ktoré majú naviazanú aminokyselinu serín a fosfatidylinozitoly alkohol inozitol. Do skupiny glycerolfosfolipidov zaraďujeme aj difosfatidylglyceroly, ktorých hlavným zástupcom je kardioplipín. (2) Kardioplipín (CL) je veľmi bohato zastúpený v membráne mitochondrií. (3)



Obrázok 1: Štruktúra glycerolfosfolipidu (4)

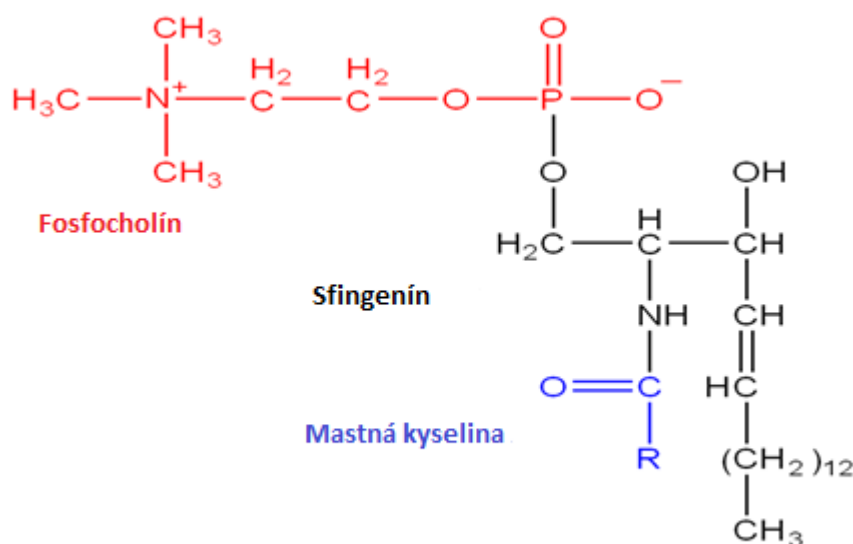
2.1.2 Sfingolipidy

Ďalšou veľkou skupinou membránových lipidov sú sfingolipidy, ktoré zväčša plnia funkciu antigénnych determinant na povrchu membrán. Do skupiny sfingolipidov patria ceramidy, sfingomyelíny a glykosfingolipidy. Spoločnou štruktúrou sfingolipidov je sfingenín (1,3-dihydroxy-2-amino-4-*trans*-oktadecén). (2)

Ceramidy majú na aminoskupine sfingenínu amidovou väzbou naviazaný acylový zbytok mastných kyselín. Najčastejšie palmitovej, steárovej alebo lignocerovej mastnej kyseliny. Ceramidy sa často vyskytujú v mozgovom tkanive. (2)

Sfingomyelíny sú najviac zastúpenými sfingolipidmi v živočíšnych bunkách. Štruktúra sfingomyelínu je znázornená na Obrázok 2. Vyskytujú sa v myelínovej pošve neurónov a tiež v bielej mozgovej hmote. Štruktúrnym základom je ceramid, avšak na hydroxylovej skupine v polohe 1 je viazaný esterovou väzbou zbytok kyseliny fosforečnej, na ktorú sa ďalej viaže cholín. (2)

Glykosfingolipidy majú na hydroxylovej skupine ceramidu naviazanú glukózu alebo galaktózu. (2) Galaktozylceramid sa vyskytuje najmä v nervovom tkanive, menej v ostatných tkanivách. Glukozylceramid naopak môžeme nájsť vo väčšom zastúpení aj v iných tkanivách okrem nervového. Do skupiny glykosfingolipidov patria tiež gangliozidy. Ich základ tvorí glukozylceramid obohatený o kyselinu N-acetylneuraminovú, ktorú radíme medzi sialové kyseliny. Všeobecne nachádzame gangliozidy v mozgovom tkanive. (3)



Obrázok 2: Príklad štruktúry sfingolipidu (sfingomyelín) (4)

2.1.3 Cholesterol

Súčasťou lipidových dvojvrstiev je tiež cholesterol, ktorý tvorí asi 25% z membránových lipidov. Jeho základom je steroidné jadro a na rozdiel od fosfolipidov je menej amfipatický, pretože obsahuje len jednu hydroxylovú skupinu. V cytoplazme eukaryot je bohato zastúpený. (1)

2.1.4 Proteíny

Membránové proteíny na rozdiel od lipidov majú svoje špecifické miesto v membráne, kde vykonávajú svoje funkcie. Navzájom sa líšia svojim typom, štruktúrou a funkciou. Poznáme dva typy membránových bielkovín a to integrálne a periférne. (5) Percentuálne zastúpenie proteínov sa líši v závislosti od funkcie danej biologickej membrány. (1)

Do skupiny integrálnych bielkovín patria také, ktoré od lipidovej dvojvrstvy môžeme oddeliť len drsnými podmienkami. To je napríklad zvýšená teplota, silné detergenty alebo vyviazanie Ca^{2+} . Vyznačujú sa tým, že často prestupujú naprieč lipidovou dvojvrstvou. Časti integrálnych bielkovín prechádzajúcich cez membránu majú na svojom povrchu vystavené hydrofóbne zvyšky aminokyselín. Zníženie veľkej vnútromolekulovej energie uhľovodíkového reťazca aminokyselín v nepolárnej časti membrány zabezpečuje sekundárna štruktúra. Najčastejšie je to α -helix. (5) Integrálne bielkoviny môžu tiež medzi sebou vytvárať elektrostatické sily, ktorými sú schopné tvoriť v membráne zložitejšie kvartérne štruktúry. (1)

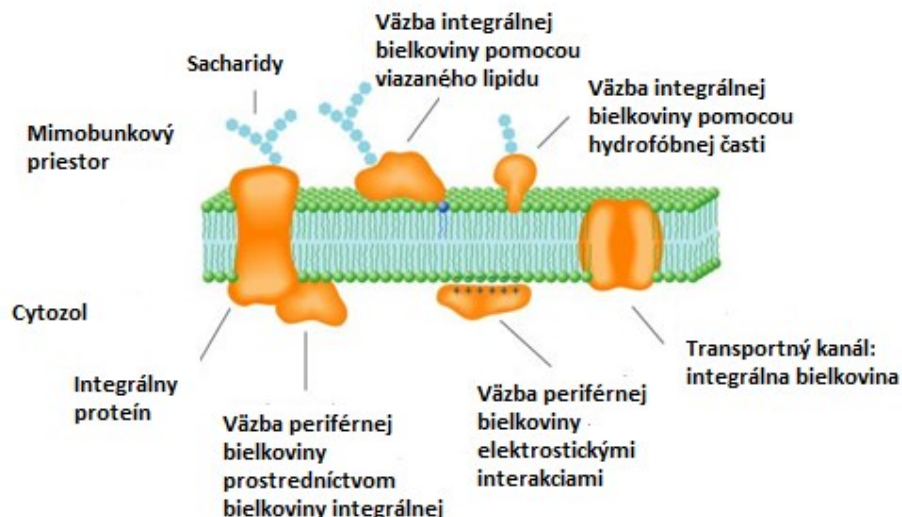
Druhým typom sú tzv. periférne bielkoviny viazané k membráne nekovalentnou väzbou. Tá môže byť elektrostatická, hydrofóbna alebo komplexná. (5) Viazu sa tak k hydrofilným častiam lipidov a integrálnych bielkovín. Štruktúrne sú periférne bielkoviny podobné s rozpustnými globulárnymi bielkovinami. (1)

2.1.5 Sacharidy

Sacharidy tvoria zo všetkých zložiek biologických membrán asi 2-10%. Vyskytujú sa hlavne vo forme oligosacharidov viazaných na lipidy a proteíny. Sú to teda glykolipidy a glykoproteíny. Slúžia tiež na rozpoznávanie buniek navzájom. (1)

2.2 Štruktúra

Štruktúru membrány schematicky znázorňuje Obrázok 3. Model, ktorý najlepšie vystihuje štruktúru membrány je model tekutej mozaiky. Fosfolipidová dvojvrstva sa v polárnom prostredí spontánne usporiada do formy uzavretého vaku. Toto usporiadanie je dôležité pre minimalizovanie energie fosfolipidových dvojvrstiev. Sily, ktoré sa podieľajú na tomto procese sú okrem hydrofóbných väzieb aj elektrostatické väzby a vodíkové mostíky. (1) Fosfolipidová dvojvrstva sa teda správa ako dvojrozmerná tekutina. Fosfolipidy sa z nej nemôžu uvoľniť do okolitého polárneho prostredia, ale v rámci dvojvrstvy majú do istej miery voľnosť pohybu. (6)



Obrázok 3: Štruktúra biologickej membrány (7)

2.2.1 Spontánne väzby tvoriace štruktúru membrán

Základná štruktúra membrán je v polárnom prostredí udržiavaná hydrofóbnymi a hydrofilnými interakciami. Vzhľadom na obojaký charakter fosfolipidov môžu vznikať vodíkové mostíky medzi polárnymi hlavičkami týchto lipidov a vodným prostredím. Medzi nepolárnymi alifatickými reťazcami fosfolipidov je interakcia nepolárna. Takto sa samovoľne vytvorí lipidová dvojvrstva oddeľujúca vnútro bunky od okolia a podobne aj ostatné oddiely bunky od seba. (5) Po pridaní čistých fosfolipidov do vodného prostredia sa tieto molekuly spontánne usporiadajú do dvojvrstvy a vytvoria vačok zvaný lipozóm s priemerom 25 nm. (6)

2.2.2 Asymetria biologických membrán

Lipidová dvojvrstva vykazuje určitú asymetriu v rámci jednotlivých vrstiev. Na extracelulárnej strane sa nachádzajú prevažne fosfatidylcholín a sfingomyelín. Na strane cytozolovej sú to fosfatidyletanolamín, fosfatidylserín a fosfatidylinozitol. (6) Tiež sacharidy sú v biologických membránach lokalizované len v extracelulárnej časti a udržiavajú tak asymetriu lipidovej dvojvrstvy. (1) Integrálne bielkoviny sú upravené glykozyláciou len na vonkajšej strane membrán. (5) Periférne bielkoviny sa taktiež nachádzajú prevažne na extracelulárnej strane biologickej membrány. (1)

2.3 Fyzikálne vlastnosti

2.3.1 Priepustnosť

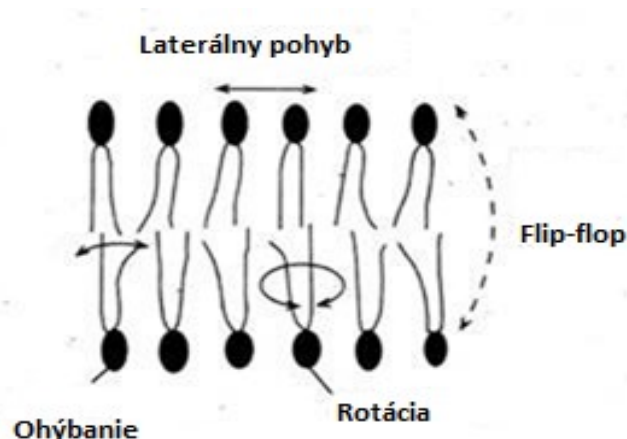
Vďaka svojej hydrofóbnej povahe tvorí membrána bariéru pre nabité ióny a makromolekuly. Na druhú stranu však netvorí úplnú izoláciu od prostredia. Jednotlivé zložky môžu v rámci usporiadanej štruktúry vykonávať náhodný Brownov pohyb, ktorý umožní prenos malých nepolárnych molekúl. (1)

Väčšie molekuly (aminokyseliny, nukleotidy, glukóza) a nabité ióny (H^+ , Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cl^- , HCO_3^-) nemôžu prechádzať cytoplazmatickou membránou voľne bez proteínových prenášačov. Naopak nepolárne molekuly plynov (O_2 , CO_2 , N_2) a nenabité polárne molekuly ako voda, glycerol alebo etanol môžu voľne prechádzať cez membránu. (6)

Okrem povahy prenášanej molekuly závisí priepustnosť membrány od jej chemického zloženia. Acylové zbytky mastných kyselín naviazané v glycerolfosfolipidoch, ich dĺžka a počet dvojitéch väzieb v rámci reťazca významne ovplyvňujú priepustnosť membrány. (2) Počet uhlíkov v acylových zbytkoch sa pohybuje od C14 do C24. (6) Mastné kyseliny v membránach môžu byť nasýtené, monoénové a polyénové. Medzi nasýtené patrí kyselina steárová (C18), palmitová (C16) a myristová (C14). Medzi monoénové palmitoolejová (C16) a olejová (C18) a z polyénových kyselina arachidónová (C20). Všetky nenasýtené mastné kyseliny vyskytujúce sa v membránach majú *cis* konformáciu. (2) Práve *cis* konformácia nenasýtených mastných kyselín umožňuje zvýšenú permeabilitu membrány. (6)

2.3.2 Pohyblivosť zložiek membrány

Jednoduché väzby medzi uhlíkmi umožňujú ohyb acylových zbytkov fosfolipidov. Táto rotácia je jeden z najčastejších pohybov membrány a prebieha v pikosekundách. Ďalej poznáme rotačnú difúziu, keď sa celá molekula fosfolipidu točí okolo svojej osi. Čas trvania tohto pohybu je cca 30 nanosekúnd. Ďalším príkladom je laterálna difúzia, to znamená, že celá molekula mení svoje miesto v rámci jednej vrstvy fosfolipidov. Molekula fosfolipidu sa pohybuje rýchlosťou v $\mu m/s$. Nakoniec sa môže molekula fosfolipidu premiestniť z jednej monovrstvy do druhej tzv. flip-flopom. Flip-flop patrí k najmenej častým pohybom. Jeho rýchlosť je v minútach, dňoch až týždňoch. (5) Obrázok 4 znázorňuje rôzne typy pohybov, ktoré vykonávajú fosfolipidy usporiadané do dvojvrstvy.



Obrázok 4: Pohyby fosfolipidov vo fosfolipidovej dvojvrstve (8)

2.3.3 Tekutosť membrány

Tekutosť membrány ovplyvňujú vonkajšie podmienky prostredia (teplota, tlak), ako aj samotné chemické zloženie membrány. (5) Je to miera voľnosti pohybu molekúl v rámci dvojvrstvy. Pri vyššej teplote sú fosfolipidy schopné pohybovať sa rýchlejšie a preto so vzrastajúcou teplotou je tekutosť membrány vyššia. Tekutosť vo veľkej miere závisí na dĺžke a stupni nasýtenia acylových zbytkov vo fosfolipidoch. Čím je ich dĺžka a stupeň nasýtenia vyššie, tým je tekutosť membrány menšia. Cholesterol so svojou rigidnou štruktúrou fluiditu membrány znižuje a celú dvojvrstvu spevňuje. (6)

Pod vzrastajúcim tlakom sú uhľovodíkové reťazce fosfolipidov usporiadanejšie, pravidelnejšie a relatívne dlhšie. Tlak pôsobiaci zo strany na plochú dvojvrstvu fosfolipidov má tendenciu viesť k zväčšeniu hrúbky danej dvojvrstvy. Zhrubnutie fosfolipidovej dvojvrstvy je sprevádzané zmenšením oblasti pripadajúcej na jeden uhľovodíkový reťazec. Teda čím je tlak pôsobiaci na membránu väčší, tým je menej tekutá. (9)

Nezávisle na cholesterole a acylových zbytkoch, môžu mať vplyv na fluiditu aj samotné fosfolipidy veľkosťou svojej polárnej časti a schopnosťou tejto časti viazať vodu. Podľa tohto parametra môžeme fosfolipidy rozdeliť na tie čo zvyšujú fluiditu (fosfatidylcholín, kardiolipín) a tie čo ju znižujú (fosfatidyletanolamín, sfingomyelín). (9) (10)

S fluiditou súvisí aj neustále rušenie a obnovovanie nekovalentných interakcií, ktoré zabezpečuje dôležitú vlastnosť membrán. Je to schopnosť membrány uzatvárať sa do váčkov, čiže zaceľovať svoje voľné rozhrania s polárnym prostredím kvôli energetickej nevýhodnosti odhalených nepolárnych častí a schopnosť zväčšovať svoj povrch po fúzii s inou membránou. (1)

Tekutosť membrány je dôležitá pre správne fungovanie membrány. Dáva možnosť membránovým proteínom aj ďalším zložkám membrány voľne difundovať a navzájom interagovať v rámci membrány. Tiež má význam pri delení buniek a signalizačných funkciách bunky. (6)

2.4 Funkcie membrán

Väčšinu hlavných funkcií biologických membrán zabezpečujú membránové bielkoviny. A sú to enzýmová aktivita, prenos látok cez membrány a štruktúrna funkcia. Tiež majú schopnosť prijímania signálov z okolia, ktorú plnia receptory. (1) Membrány sú tiež schopné rôznou distribúciou iónov udržiavať na svojom povrchu určitý elektrický potenciál. Jeho hodnoty sa pohybujú v milivoltoch. (11)

2.4.1 Udržiavanie elektrochemického gradientu

Pokojoiný membránový potenciál

Pokojoiný membránový potenciál charakterizujeme ako rozdiel elektrického potenciálu na oboch stranách membrány. Je to vlastne napätie na polopriepustnej membráne, ktoré vzniká v dôsledku pôsobenia náboja a koncentrácie iónov na každej strane membrány. Tento potenciál nazývame elektrochemický. Na membráne živej bunky za pokojového stavu sa vytvorí prostredníctvom sodných, chloridových, draselných a vápenatých iónov pokojoiný membránový potenciál. Tento rozdiel vzniká kvôli rozdielnej priepustnosti membrány pre daný ión. Vzniká tiež preto, že ióny voľne difundujú po svojom koncentračnom a elektrickom gradiente a nakoniec je to sodno-draselná pumpa, ktorá za spotreby adenosíntrifosfátu (ATP) transportuje ióny cez membránu proti elektrochemickému gradientu. Po zmeraní napätia vnútri bunky elektródou zistíme, že intracelulárne prostredie je oproti okoliu nabité záporne. (12)

Akčný membránový potenciál

Bunky nervové, ako aj bunky myokardu alebo kostrového svalstva majú schopnosť tvoriť vzruchy. (13) Vzrušivosť membrány je jej schopnosť šíriť akčný potenciál. (11)

Vznik akčného potenciálu môžeme vyvolať malým vychýlením pokojového membránového potenciálu. Teda ak zmeníme pokojoiný potenciál na prahový potenciál cca o 15 mV smerom ku kladnejším hodnotám. Dôsledkom je zvýšená priepustnosť membrány pre sodné ióny intracelulárne, ale priepustnosť pre draselné katióny sa takmer nezmení. Týmto procesom dôjde k zvýšeniu potenciálu zo záporných hodnôt k nulovým hodnotám. Môže nastať až transpolarizácia, kedy je vnútro bunky oproti prostrediu nabité kladne. Následuje fáza repolarizácie, kedy bunka obnovuje svoj pokojoiný potenciál zvýšením priepustnosti pre draselné ióny extracelulárne. Môže

nastať až hyperpolarizácia, čiže zníženie potenciálu pod hodnotu pokojového potenciálu. Tento časový úsek nazývame refraktérnou fázou. (11) (13)

Prahový potenciál je hodnota membránového potenciálu, ktorá vznikne dostatočne rýchlou depolarizáciou membrány, čiže posunom pokojového membránového potenciálu cca o 10-20 mV ku kladnejším hodnotám. V dôsledku dosiahnutia prahovej hodnoty potenciálu dochádza k veľmi rýchlej depolarizácii. (14)

2.4.2 Signalizačná funkcia proteínov

Výmena informácií na úrovni cytoplazmatickej membrány je spojená s naviazaním signálnej molekuly, tzv. agonistu, na bielkovinový receptor zakotvený v membráne. Po naviazaní agonistu na receptor nastane konformačná zmena receptora, čím sa receptor aktivuje a prenáša informáciu do vnútra bunky viacerými spôsobmi. (5)

Receptory spojené s iónovými kanálmi

Zloženie iónov v cytozole a extracelulárnom prostredí je značne odlišné. Po otvorení iónovo špecifického kanála začne ión, pre ktorý je daný kanál určený, veľmi rýchlo prenikať po svojom elektrochemickom gradiente. Týmto spôsobom sa zmení aj membránový potenciál, ktorého veľkosť môžeme vypočítať pomocou Goldmanovej rovnice:

$$\Delta\varphi = \frac{RT}{F} \ln \frac{P_{Na} [Na]_e + P_K [K]_e + P_{Cl} [Cl]_i}{P_{Na} [Na]_i + P_K [K]_i + P_{Cl} [Cl]_e} \quad (1)$$

e, i indexy pre označenie extracelulárneho a intracelulárneho priestoru, v ktorom sa dané koncentrácie iónov (v hranatých zátvorkách) nachádzajú

R molárna plynová konštanta (8,314472 JK⁻¹mol⁻¹)

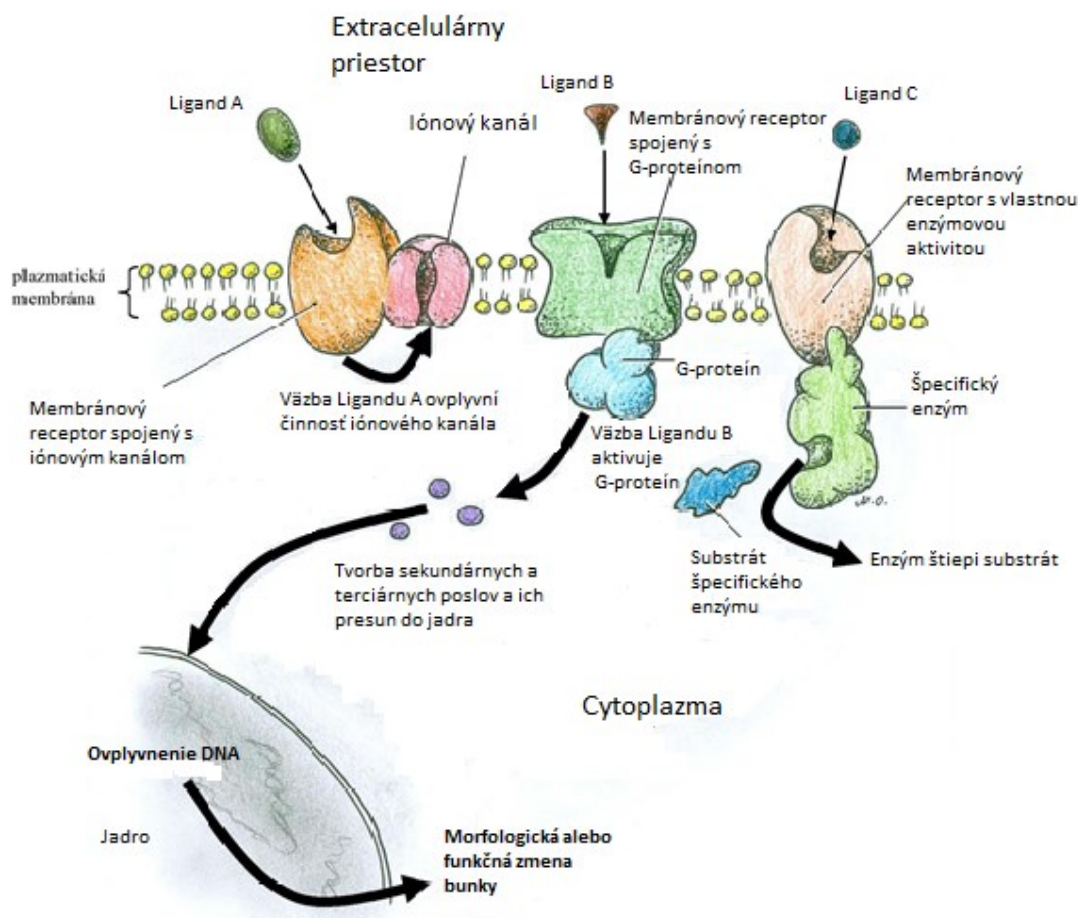
T termodynamická teplota

F Faradayová konštanta (96 481 C mol⁻¹)

Δφ zmena membránového potenciálu

P priepustnosť membrány pre daný ión

Z tohto vzťahu vyplýva, že membránový potenciál bude závislý na ióne, ktorý membrána vo zvýšenej miere v daný moment prepúšťa. Tento typ signalizácie je nevyhnutný pre šírenie signálu medzi nervovými bunkami. (5) Schematické znázornenie iónového kanála je na Obrázok 5.



Obrázok 5: Základné typy membránových receptorov (15)

Receptory s vlastnou enzýmovou aktivitou

Receptory s enzymatickou aktivitou zobrazené na Obrázok 5 sa bežne nachádzajú v neaktívnej forme. Po naviazaní agonistu resp. aktivátoru na extracelulárnu alosterickú časť receptoru sa konformácia tohto receptoru zmení. Zmena konformácie je signálom pre aktiváciu intracelulárnej časti receptoru s enzymatickou aktivitou. Poznáme viac typov enzymatických receptorov. Napríklad guanylátcyklázy katalyzujú tvorbu cyklického guanozínmonofosfátu (cGMP). Ďalej existujú tyrozínové proteínkinázy a proteínfosfatázy a serínové/treonínové proteínkinázy. Proteínkinázy katalyzujú fosforyláciu proteínov a proteínfosfatázy podporujú hydrolýzu väzby fosfátu a proteínu. (5)

Receptory spojené s G-proteínom

G-proteíny sú prenášačmi informácie medzi receptorom a ďalšou molekulou v signálnej dráhe ako môžeme vidieť na Obrázok 5. Viažu guanozíntrifosfát (GTP) a nachádzajú sa väčšinou na intracelulárnej strane bunkovej membrány. Aktívny receptor s naviazaným ligandom aktivuje G-proteín zložený z 3 podjednotiek α , β a γ . Po aktivácii je G-proteín schopný väzby GTP na svoju α -podjednotku. Následne sa trimérny komplex G-proteínu rozpadne a α -podjednotka za súčasnej hydrolýzy GTP aktivuje ďalšiu molekulu signálnej dráhy. Ďalšia molekula je efektorová molekula a môže ňou byť adenylátcykláza, fosfolipáza C alebo iónovo špecifické vápenaté kanály. Podjednotka α sa po hydrolýze GTP opäť pripojí na zvyšok komplexu G-proteínu čiže k spojeným podjednotkám β a γ . (5)

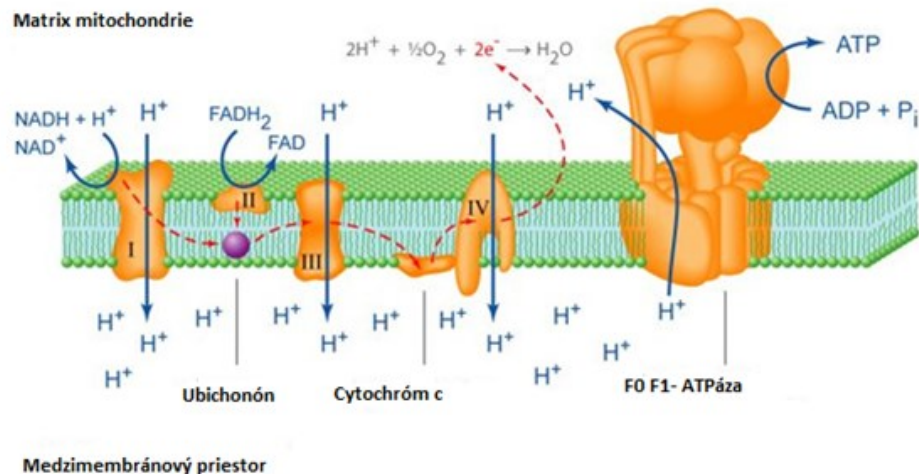
Receptory vyvolávajúce endocytózu

Na povrchu membrány môžeme nájsť receptory, ktoré veľmi špecificky viažu daný ligand. Naviazaním ligandu sa zmení konformácia receptora, ktorá vyvolá prilnutie proteínu zvaného klatrín na vnútornú stranu membrány okolo aktivovaného receptora. Tak sa začne vytvárať jamka v plazmatickej membráne s klatrínovým plášťom až vznikne endocytotický vačok, čo znázorňuje Obrázok 8 časť c na strane 23. Tento vačok obsahuje väčšinou chemickú látku, ktorá vyvolala aktiváciu endocytózy. (5)

2.4.3 Enzymatická aktivita

Ako príklad membránového enzýmu môže byť multienzymový komplex vo vnútornej membráne mitochondrií dôležitý pre dýchací reťazec. Tento komplex znázorňuje Obrázok 6. Multienzymový komplex tvoria 4 komplexy integrálnych bielkovín slúžiacich ako enzýmy (tzv. oxidoreduktázy) a 2 pohyblivé prenášače elektrónov. Okrem toho, táto membrána obsahuje aj enzymový komplex pre aeróbnú oxidačnú fosforyláciu, ktorá je spriahnutá s dýchacím reťazcom. (1)

Na prvom komplexe dochádza k oxidácii $\text{NADH} + \text{H}^+$ (redukovaný nikotínamid adenín dinukleotid) koenzýmom Q tzv. ubiquinónom. Druhý komplex tiež oxiduje FADH_2 (redukovaný flavín adenín dinukleotid) koenzýmom Q. Mobilný koenzym Q je chinón s izoprenoidným postranným reťazcom, ktorý mu dodáva nepolárny charakter a preto môže ľahko difundovať v nepolárnej časti lipidovej membrány. Koenzým Q predáva elektróny tretiemu ukotvenému enzymovému komplexu nazývanému cytochrómreduktáza. Cytochróm c ako druhý mobilný prenášač elektrónov sa redukuje na treťom komplexe a následne sa oxiduje na komplexe štvrtom, ktorý inak nazývame cytochrómxidáza. V tomto reťazci nedochádza len k prenosu elektrónov, ale aj k vytvoreniu protonového gradientu, ktorý je dôležitý pre ATP-ázu mitochondrií. Mitochondriálna ATP-áza je schopná tvoriť ATP. (1)



Obrázok 6: Multienzymový komplex dýchacieho reťazca s ATP-ázou (16)

2.4.4 Membránové prenášače

Membránové prenášače sú bielkoviny inak nazývané aj špecifické kanály, ktoré počas svojej aktivity výrazne menia konformáciu. Tiež ich označujeme aj ako translokázy. Aktívne sú vo svojich dimérnych či oligomérnych štruktúrach, keď vytvárajú v membráne hydrofilný kanál pre uľahčenie prenosu iónov a molekúl. Riadi ich viac vplyvov. Poznáme prenášače riadené koncentračným spádom prenášanej molekuly ako sú napríklad transportéry glukózy. Ďalej môžu byť riadené napäťovo. Napäťovo riadené kanály sa uplatňujú hlavne pri vedení nervového vzruchu. Prenášajú teda najmä ióny Na^+ a K^+ . Tretí typ prenášačov je riadený chemicky. Tento typ prenášačov je riadený naviazaním ligandu na vlastný povrch daného prenášača. Príkladom môže byť kanál pre Ca^{2+} na postsynaptických membránach neurónov riadený neurotransmitermi. Ďalší typ prenášačov je riadený mechanicky. Typickým príkladom sú vlásokové bunky v uchu, ktoré po mechanickom podnete otvoria kanály pre Ca^{2+} a tak spustia depolarizáciu membrány a ďalšie vedenie vzruchu do mozgu. Špeciálnu skupinu tvoria prenášače pre nešpecifický transport. Tvoria ich bielkoviny zvané poríny. Ich štruktúra prechádzajúca cez membránu je β -skladaný list. Môžu mať rôznu veľkosť priemeru od 0,5 nm až po jadrové póry s priemerom 10 nm. Jadrové póry musia umožniť prestup bielkovinám ako sú transkripčné faktory do jadra. (5)

3. TRANSPORT LÁTKOK V ORGANIZME

Cytoplazmatická membrána oddeľuje vnútro bunky od vonkajšieho prostredia, ale neizoluje bunku úplne. Pre zachovanie života bunky musí fungovať transport látok cez membránu. Látky dôležité pre životné procesy do bunky vstupujú a odpadové látky bunka vylučuje. (17)

3.1 Pasívny transport

Pod pasívny transport spadá difúzia, osmóza a uľahčená difúzia. (17) Pasívny transport látok môže prebiehať priamo cez membránu alebo cez rôzne iónové kanály. Poznáme kanály ovládané napätím, ligandom, mechanicky alebo náhodne otvárané. Na prenos vody zvyčajne slúžia kanáliky zvané aquaporíny. Na tento typ transportu nie je potrebná energia. Látky sa samovoľne pohybujú po svojom koncentračnom, osmotickom alebo elektrickom gradiente. (18)

3.1.1 Donnanova rovnováha

Membránou môžu prechádzať ióny Na^+ , K^+ , Cl^- , Ca^{2+} . Existujú však ióny, ktoré prechodu cez membránu nie sú schopné. Sú to väčšinou anióny a kationy bielkovín. Ióny neschopné difúzie tak ovplyvňujú rozdelenie menších iónov na jednotlivých stranách membrány. Pre výpočet koncentrácie iónu schopného difúzie použijeme vzťah pre Donnanovu rovnováhu:

$$c_{\text{K}^+} \cdot c_{\text{Cl}^-} = c_{\text{K}^+}^* \cdot c_{\text{Cl}^-}^* \quad (2)$$

hviezdička značí koncentráciu príslušného iónu v roztoku bez nedifuzibilného iónu. (11)

3.1.2 Difúzia

Difúzia sa uskutočňuje vždy po koncentračnom spáde difundovanej látky, čiže je snaha vyrovnať koncentráciu tejto látky v oboch kompartmentoch. (17) Rýchlosť difúzie sa riadi 1. Fickovým zákonom:

$$\frac{n}{A\tau} = -D \cdot \frac{\Delta c}{\Delta x} \quad (3)$$

D konštanta vyjadrujúca difúzny koeficient v (m^2/s), čo je počet mólov rozpustenej látky, ktoré prejdú za 1 sekundu prierezom 1 m^2 pri jednotkovom koncentračnom spáde. (záporné znamienko znamená tok látky proti gradientovému vektoru, ktorý má smer opačný)

A	plocha celkového prierezu membrány (m^2)
τ	čas (s)
n	počet mólov rozpustenej látky
Δc	rozdiel koncentrácií na membráne
Δx	vzdialenosť 2 miest s gradientom koncentrácie difundovanej látky, teda pomer $\frac{\Delta c}{\Delta x}$ je koncentračným gradientom. (19)

3.1.3 Uľahčená difúzia

Pri tomto type transportu látky využívajú bielkovinové prenášače zakotvené v membráne. Od jednoduchej difúzie sa odlišuje hlavne v tom, že pri neustálom zvyšovaní koncentrácie difundovanej látky sa kapacita prenášačov môže vyčerpať a rýchlosť difúzie tak nebude priamo úmerná koncentrácii difundovanej látky. (19)

3.1.4 Osmóza

Semipermeabilná membrána priepustná len pre rozpúšťadlo oddeľuje roztoky s rôznymi koncentráciami. Rozpúšťadlo prestupuje z prostredia s nižšou koncentráciou do prostredia s vyššou koncentráciou rozpustených látok. Tento jav pokračuje, až kým sa koncentrácie nevyrovnajú. Osmotický tlak je teda tlak potrebný na zastavenie osmózy. Kvantitatívne osmotický tlak môžeme vyjadriť van't Hoffovým zákonom. Tento zákon vyjadruje, že osmotický tlak je za stálej teploty priamo úmerný počtu častíc v roztoku a vyjadruje to vzťah:

$$\pi = i \cdot c \cdot R \cdot T \quad (4)$$

i	van't Hoffov opravňový koeficient
c	molárna koncentrácia roztoku
π	osmotický tlak (19)

Pre bunky živočíchov platí, že v hyperosmotickom prostredí vodu strácajú a následkom toho dochádza k zmenšovaniu ich objemu. Naopak v hypotonickom roztoku živočíšna bunka vodu nasáva do svojho vnútra. Toto môže viesť až k rozrušeniu celistvosti membrány. (17)

3.2 Aktívny transport

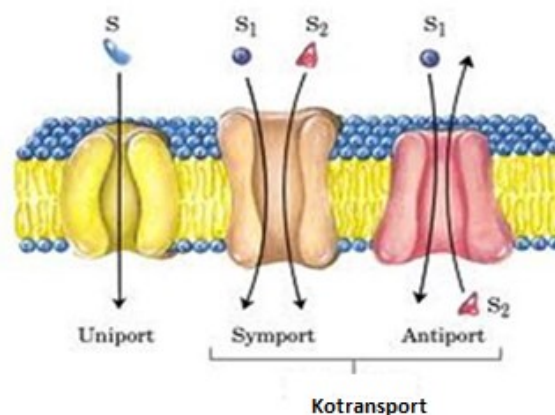
Prestup molekúl a iónov cez membránu proti ich koncentračnému alebo elektrickému gradientu za spotreby energie nazývame aktívny transport. Uskutočňuje sa cez prenášačové proteíny s ATP-ázovou aktivitou. To znamená, že daný prenášač alebo iónový kanál dokáže využiť energiu hydrolýzou ATP. (18) Ak je pre aktívny transport využitá energia vo forme ATP označujeme ho ako primárny aktívny transport. (19)

3.2.1 Príklad primárne aktívneho transportu

Na/K-ATP-áza tiež nazývaná ako sodno-draselná pumpa má za úlohu udržiavať osmotickú rovnováhu v živočíšnych bunkách. Tiež pomáha udržiavať membránový potenciál. Má spotrebu asi 30% celkového ATP bunky. Jej primárnou funkciou je transport 3 katiónov Na^+ do extracelulárneho prostredia proti ich elektrochemickému gradientu a zároveň 2 katiónov K^+ opačným smerom. (6)

Uniport a Kotransport

Pojem uniport znázornený na Obrázok 7 označuje prenos len jednej molekuly alebo iónu membránovým prenášačom. (18) Kotransport nemusí využívať len energiu ATP, ale aj koncentračný či elektrický gradient jedného z prenášaných iónov. (6) Kotransportom sa teda cez membránu môžu dostať dve či viaceré molekuly resp. ióny ako vidíme na Obrázok 7. Ak transport oboch častíc prebieha v jednom smere hovoríme o symporte. Antiportom označujeme dej, keď častice putujú oproti sebe. (18) Ak je pre transport jednej látky proti jej elektrochemickému gradientu využitý gradient druhej látky, označujeme tento transport ako sekundárne aktívny transport. Ako sekundárne aktívny transport môžeme označiť aj pasívny transport, ktorý potrebuje pre svoje fungovanie iný aktívny transport. (20)



Obrázok 7: Niektoré typy aktívneho transportu (21)

3.2.2 Príklad sekundárne aktívneho transportu

Typickým príkladom tohto typu transportu je prenos glukózy do enterocytu za využitia gradientu Na^+ . Gradient Na^+ vytvorený Na/K-ATP-ázou môže slúžiť ako palivo pre aktívny transport glukózy do enterocytu proti jej koncentračnému gradientu. Konkrétne sa jedná o symport. (6)

3.3 Transport látok v membránovom kontinuu

Cytóza je všeobecné označenie pre príjem a výdaj látok bunkou. Prenášané látky sú obalené membránou. Endocytóza znamená pohltenie látok bunkou a exocytóza naopak výdaj. (18) Pre endocytózu sprostredkovanú receptormi je typická vysoká špecifita pre výber látok, ktoré budú bunkou pohltené. (5)

3.3.1 Endocytóza

Fagocytóza

Keď bunka pohlcuje väčšie častice hovoríme o fagocytóze. Pomocou cytoplazmatických výbežkov si častice zachytí, obalí cytoplazmatickou membránou a pohltní za vzniku fagocytárnej vezikuly. Fagocytózu znázorňuje Obrázok 8 časť a. (18)

Pinocytóza

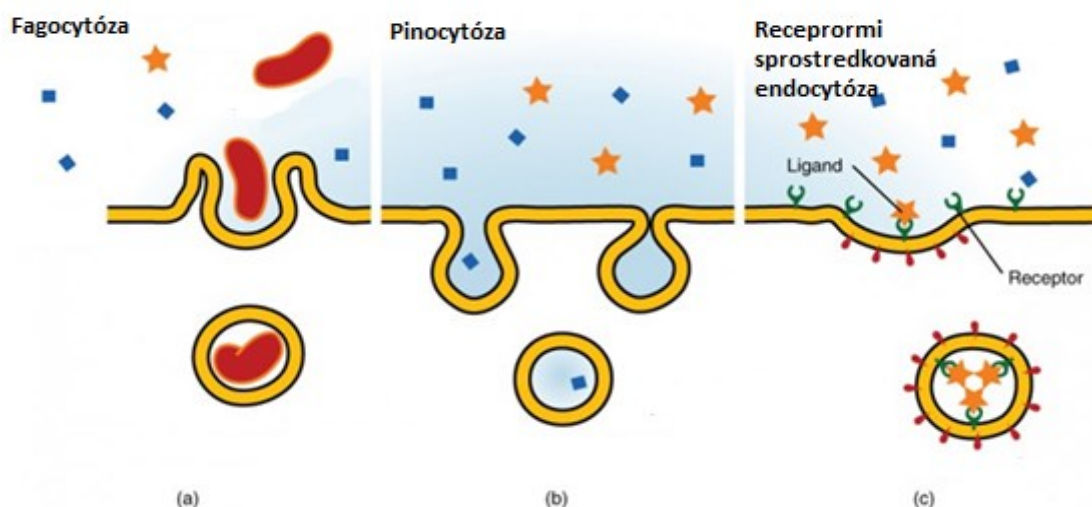
Pre príjem roztokov z prostredia bunka využíva pinocytózu. Pinocytóza je znázornená na Obrázok 8 v časti b. Jej priebeh je podobný ako u fagocytózy. Týmto procesom vzniknú pinocytárne vačky. Ďalej tieto vačky môžu splynúť s endozómami alebo lyzozomálnymi vezikulami ako pri fagocytóze. Treťou možnosťou je ich využitie na transcytózu. (18)

Transcytóza

Pojem transcytóza označuje len transport látok cez bunku a zahŕňa v sebe endocytózu, prenos látok obalených membránou cez cytoplazmu bunky a následne uvoľnenie obsahu vezikuly z bunky. (18)

Receptormi sprostredkovaná endocytóza

Endocytóza sprostredkovaná receptormi je špecifický proces viazaný na receptory. Integrálny glykoproteín v úlohe receptora naviaže ligand. Táto väzba spôsobí, že molekuly klathrínu v cytozole sa začnú viazať na membránu v mieste tejto väzby. Adaptíny umožnia spojenie integrálneho receptora s polymérom klathrínu a vyvinie sa tak obalená jamka a neskôr obalená vezikula. Tento transportný proces je znázornený na Obrázok 8 v časti c. (18)



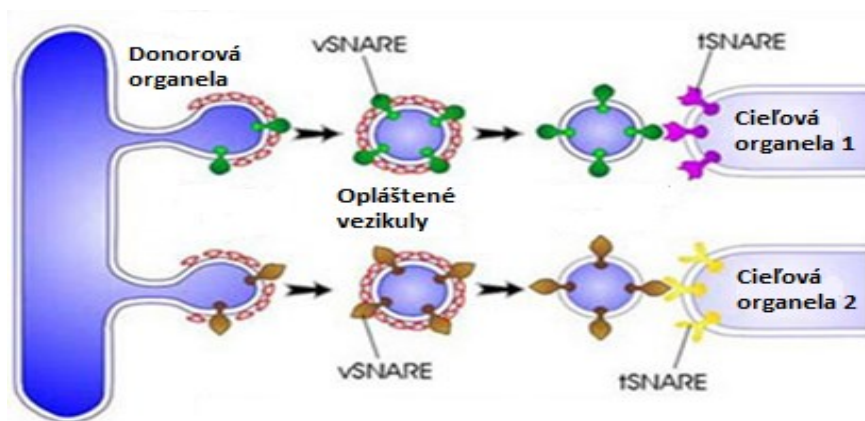
Obrázok 8: Niektoré typy transportu látok v membránovom kontínuu (22)

3.3.2 Exocytóza

Vysokomolekulárne látky tvorené intracelulárne v endoplazmatickom retikule (ER) sú skladované vo vačkoch. Tieto vačky uvoľnia svoj obsah do extracelulárneho prostredia po prijatí signálu zvonku a zloženie ich membrány je podobné zloženiu cytoplazmatickej membrány. Samotný proces prebieha tak, že vaček splynie s plazmatickou membránou a tak uvoľní v ňom obsiahnuté látky do extracelulárneho prostredia. (5)

3.3.3 Transport látok vnútri bunky

Medzi endoplazmatickým retikulom a Golgiho aparátom sa látky transportujú vo vezikuloch. Vezikuly sa odškrucujú za pomoci GTP-ázovej aktivity dynamínu a súčasného obaľovania COP-proteínmi (coating proteins). Nakoniec špecifitu fúzie vezikúl a cieľovej membrány zabezpečujú adresné proteíny v-SNARE a t-SNARE (v-vesicle ,t-target, Soluble NSF Attachment Protein REceptors, NSF= N- ethylmaleimide Sensitive Fusion) znázornené na Obrázok 9. (18)



Obrázok 9: Cieľný transport medzi organelami vnútri bunky (23)

4. KOMPARTMENTY EUKARYOTICKEJ ŽIVOČÍŠNEJ BUNKY

Kompartmentom nazývame priestor ohraničený biologickou membránou. Inak ho tiež môžeme definovať ako útvar zložený z biologickej membrány, ktorý oddeľuje svoje vnútorné prostredie od okolitého prostredia. (18)

4.1 Jadro

Priemer tejto organely je 5-10 μm . Vnútorný obsah jadra je obklopený dvoma paralelnými membránami. Tieto sú od seba oddelené priestorom zvaným perinukleárna cisterna, ktorá má šírku 40-70 nm. Vnútorná membrána jadra obsahuje integrálne proteíny, ktoré ukotvujú vnútorný cytoskelet jadra. Vonkajšia membrána jadra voľne prechádza v ER. Vonkajšia aj vnútorná membrána obsahujú jadrové póry. Jadrové póry s priemerom 70 nm sú vystlané nukleoporínmi. Na cytoplazmatickej strane jadrových pórov je jadrový kôš a ten slúži ako filter pre vstup látok do jadra. (18)

4.2 Endoplazmatické retikulum (ER)

ER je komplex membrány, ktorá oddeľuje vnútro tohto bunkového kompartmentu od cytoplazmy. Poznáme drsné a hladké ER. Drsné ER je voľným pokračovaním jadrovej membrány a obsahuje na svojom povrchu ribozómy. Ribozómy sú k membráne ER pripojené integrálnymi membránovými proteínmi. Sú to riboforín I. a II. a spájajú veľkú podjednotku ribozómu s membránou ER. Drsné ER plynule prechádza do hladkého ER. (18)

Proteíny syntetizované na drsnom ER sú určené na vylúčenie z bunky exocytózou. Tiež sú tu syntetizované integrálne membránové proteíny a lyzozomálne hydrolytické enzýmy. Riboforíny I. a II. tiež slúžia pre prenos syntetizovaného polypeptidového reťazca do lumen ER. Budúce integrálne membránové proteíny sa uvoľňujú priamo do

membrány ER laterálnou difúziou. Hladké ER okrem iných dôležitých funkcií má funkciu tvorby fosfolipidov a steroidov a ich usporiadania sa do biologických membrán. (18)

4.3 Golgiho aparát (GA)

GA je tvorený systémom plochých cisterien, vezikúl a vakuol. Transportné vezikuly spájajú GA s drsným ER. Produkty drsného resp. granulárneho ER sú vezikulami dopravené do GA na ďalšiu úpravu. Vakuoly naopak slúžia na skladovanie produktov GA. V GA dochádza ku glykozylácii, sulfatácii a fosforylácii produktov ER. Vznikajú tak glykolipidy, glykoproteíny aj glykosaminglykány. Tiež spracováva sekrečné produkty bunky, koncentruje ich a obaľuje membránou. Tak vznikajú sekrečné vezikuly (granulá). GA taktiež triedi vzniknuté proteíny a upravuje integrálne bielkoviny. Po úprave sú aj spolu s časťou membrány zabudované napríklad do cytoplazmatickej membrány. (18)

4.4 Mitochondrie

Mitochondrie sú organely s priemerom asi 0,5-1 μm sférického tvaru a môžu dosahovať dĺžku až 10 μm . Sú to organely ohraničené dvoma membránami. Vonkajšia membrána je veľmi permeabilná, pretože obsahuje poríny (integrálne prenášačové bielkoviny). Vnútoraná membrána je naopak takmer nepriepustná. Napriek tomu, že obsahuje 80% proteínov, jej nepriepustnosť je daná vysokým zastúpením CL. Vnútoraná membrána má vďaka mitochondriálnym kristám oveľa väčší povrch, ktorý je dôležitý pre pochody prebiehajúce na ňom. Funkcia mitochondrií je úzko spojená s ich membránami. Na vnútornej membráne prebieha oxidácia vodíku na vodu v dýchacom reťazci a oxidatívna fosforylácia. Tieto deje sú dôležité pre získavanie univerzálnej energie vo forme ATP. (18)

5. METÓDY VYUŽÍVANÉ PRE ŠTÚDIUM MEMBRÁN

5.1 *Mikroskopia atómových síl*

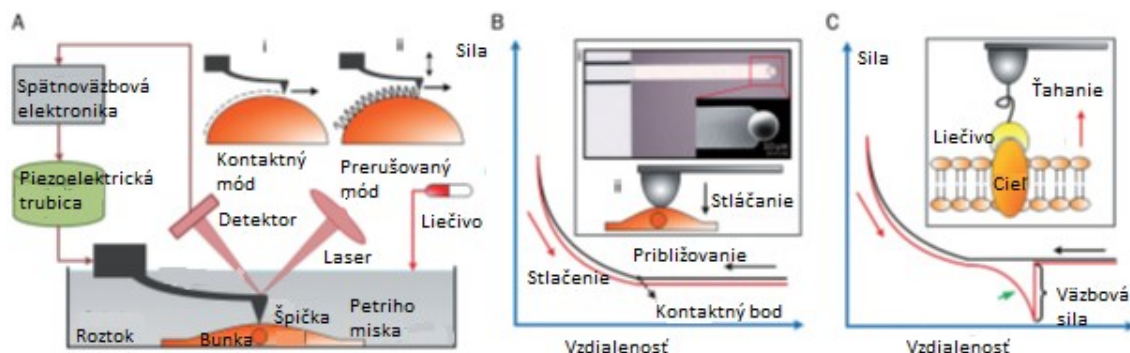
Využitie

Vynález Atomic Force Microscopy (AFM) v preklade mikroskopia atómových síl, umožňuje sledovať a objavovať funkčné komponenty živej bunky s nanometrovým rozlíšením. (24)

Výhody AFM sú, že na rozdiel od iných mikroskopií umožňuje pozorovanie živých buniek vo vodnom roztoku, takže je možné pozorovať dynamické zmeny štruktúr bunky ako ich odpoveď na liečivo. AFM zobrazí integrálne proteíny v ich prirodzenom prostredí v submolekulárnom rozlíšení a tak je možné priamo pozorovať morfológické zmeny cieľových molekúl navodené liečivami. Možnosť pozorovania týchto zmien odhalí detailnú dynamiku molekúl a tým aj dynamiku rôznych asociačných a disociačných procesov, čo nahradí metódu simulácie dynamiky molekúl. V súčasnosti technika AFM vie získať rôzne fyzikálno-chemické parametre (morfológiu, elasticitu, deformáciu membrány a rozptyl energie) biologických systémov v relatívne krátkom čase na úrovni rozlíšenia štruktúr v nanometroch. Podobne získa aj vlastnosti buniek v odpovedi na rôzne liečivá napr. väzbovú silu liečiva na receptor. (24) V roku 2010 Fantner a kol. použili AFM na zobrazenie dynamických zmien na bakteriálnych bunkách v odpovedi na antimikrobiálny peptid a odhalili, že povrch baktérie sa zmenil z hladkého na ryhovaný. (25)

Inštrumentácia

Hlavné komponenty AFM sú piezoelektrická vodivá trubica spojená s pružným konzolovým nosníkom ukončeným ostrým koncom, laserový fotodiódový detektor a spätno-väzbová elektronika ako vidíme na Obrázok 10:



Obrázok 10: Princíp mikroskopie atómových síl (24)

V časti A sú znázornené hlavné komponenty AFM, i je kontaktný mód a ii je mód prerušovaný. V časti B je znázornené meranie elastických vlastností povrchu bunky. i je obrázok sférickej sondy, ii je schéma merania. V časti C je meranie sily väzby ligandu na receptor. (24)

Princíp

Zobrazovanie povrchu vzoriek (topografia) je najdôležitejšou úlohou AFM. Sú známe dva módy výkonu skenovania povrchu vzorku. (24)

Pri kontaktnom móde sa ostrá špička konzolového nosníku pohybuje po povrchu spojite, zatiaľ čo zmeny polohy konzolového nosníku sú zaznamenávané fotodiódovým detektorom. Detektor monitoruje lúč laserového svetla odrazeného od zadnej strany konzolového nosníku. Konzolový nosník je poháňaný vertikálne piezoelektrickou trubicou pre udržanie konštantného vychýlenia vzhľadom na elektroniku so spätnou väzbou, čím sa udržiava konštantná sila zaťaženia vzorku. (24)

V prerušovanom móde konzolový nosník kmitá určitou frekvenciou a je skenovaný povrch vzorky. V tekutinách je často hnacia frekvencia konzolového nosníku okolo 10 kHz. Elektronika so spätnou väzbou riadi piezoelektrickú trubicu, ktorá poháňa konzolový nosník. Takto je zabezpečený vertikálny pohyb nosníku s jeho konštantným vychýlením. (24)

Kontaktný mód je v praktickom použití najrozšírenejší pre získanie obrázkov živých adherovaných buniek s vysokým rozlíšením a obrázkov natívnych proteínov. (26) (27) Avšak pre suspendované živé bunky cicavcov je vhodnejší prerušovaný mód, pretože je k povrchu vzorku šetrnejší a nepoškodí ho. Tento mód je tiež vhodný pre skenovanie o vysokej rýchlosti a pre zobrazovanie viacerých parametrov. (28) (29) V podmienkach blízkych fyziologickému prostrediu (pufor) môžeme priamo pozorovať dynamické zmeny bunkových štruktúr. Po pridaní liečiva do vzorku, tak môžeme posúdiť účinok daného liečiva na jednotlivé bunky. Imobilizáciou bunkovej membrány na podporný substrát (napr. sfúda), môžeme pozorovať účinok liečiva na konkrétnu cieľovú molekulu. AFM nám umožňuje odhaliť detailnú molekulárnu dynamiku disociačného

procesu a silu jeho väzby jednoduchým odťahovaním molekuly liečiva od jeho cieľovej štruktúry rôznou silou. (24)

Meranie elasticity

Dôležitou aplikáciou AFM je meranie elasticity danej bunky po stimulácii liečivom pre posúdenie účinku z hľadiska mechaniky bunky. Pre meranie elastických vlastností buniek špička vykonáva pohyb priblíženia a oddialenia sa od bunkového povrchu. Počas tohto procesu je zaznamenávané vychýlenie nosníku a pohyb piezoelektrickej trubice pre zostrojenie silových kriviek. Obrázok 10 časť B na strane 27 znázorňuje schematický diagram silovej krivky získanej počas cyklu priblíženia a oddialenia. Silová krivka obsahuje dve komponenty: krivku priblíženia a krivku oddialenia. Pre zistenie bodu kontaktu sférického konca nosníku a povrchu bunky použijeme krivku priblíženia (čierna krivka). Vychýlenie nosníka je konštantné, až kým špička nezačne tlačiť na bunku. V bode kontaktu sa krivka priblíženia začne ohýbať. Z týchto kriviek je možné vypočítať Youngov modul popisujúci elasticitu membrány. (30)

Meranie väzbovej sily

AFM metóda môže byť použitá aj na kvantifikáciu interakcií liečiva a cieľovej štruktúry, čiže na meranie väzbovej sily. Na konci nosníku je upevnená molekula liečiva. Nosník vykonáva opakovane pohyb priblíženia a oddialenia sa od povrchu. Ak narazí na cieľovú štruktúru liečiva, liečivo sa na ňu naviaže a následným pohybom od povrchu je zaznamenávaný nelineárny pík vyvážovania liečiva na silovej krivke oddialenia sa. Výška píku je úmerná väzbovej sile medzi liečivom a cieľovou štruktúrou ako nám znázorňuje Obrázok 10 časť C na strane 27. (31)

Zobrazenie natívnych cieľových molekúl

Po navrátení purifikovaných membránových proteínov do lipidovej dvojvrstvy pre napodobnenie ich prirodzeného prostredia môžeme pomocou AFM pozorovať jednotlivé natívne membránové proteíny počas ich fungovania. AFM nám tak poskytuje doplňujúce a odlišné informácie aké nám poskytujú tradičné metódy. V roku 2011 Mari a kol. zobrazili konformačnú zmenu draslíkového kanálu riadeného ligandom. Obrázky z AFM jasne ukázali, že naviazanie cyklického adenosínmonofosfátu (cAMP) môže viesť k otvoreniu draslíkových kanálov, kdežto v neprítomnosti cAMP boli zatvorené. (32)

Tradičné metódy štruktúrálnej biológie ako napríklad röntgenová kryštalografia a elektrónová mikroskopia nám poskytnú iba statický obraz štruktúr membránových proteínov. Na rozdiel od nich AFM zobrazí dynamické konformačné zmeny jednotlivých natívnych membránových proteínov v odpovedi na vonkajší stimul napr. liečivo. Poskytuje tak priamy dôkaz účinku liečiva na jednotlivé molekuly *in situ*. Okrem 2D morfológie nám môžu odhaliť dynamiku rozvíjania membránového proteínu ťahaním

za jeho oba konce. Súčasné molekulárne simulácie sú založené na 3D štrukturálnych údajoch získaných tradičnými metódami štrukturálnej biológie. Informácie získané pomocou AFM poskytnú doplnkové údaje, ktoré môžu zlepšiť počítačové simulácie interakcie liečiva a cieľovej štruktúry. (24)

5.2 Počítačová mikroskopia

Počítačová mikroskopia je metóda použitia výpočtovej techniky pre simuláciu dynamiky molekúl. Táto metóda je schopná zachytiť vzájomné pôsobenie lipidov a proteínov v čase a priestore, čím sa líši od iných metód. (33) Nedávne pokroky v tejto oblasti metód štúdia membrán umožňujú pozorovať nielen jednotlivé atómy, ale aj komplexy molekúl a dokonca aj zložité bunkové kompartmenty. (34) Môže slúžiť ako alternatívna metóda ku konvenčným metódam, ako sú napríklad AFM alebo fluorescenčná mikroskopia. Poskytuje informácie napr. o dynamike interakcií, konformačných zmenách proteínov alebo transporte. (33)

Výhodami počítačovej mikroskopie je rozlíšenie štruktúr až na úroveň atómov. Tiež možnosť štúdia membrány v podmienkach, ktoré pri skutočných experimentoch ťažko dosiahneme. (33) Avšak dôležitá pre výsledok je presnosť molekulárneho modelu. Je snaha korigovať túto skutočnosť porovnaním s klasickými experimentmi. Ďalšou nevýhodou je obmedzená škála systémov, čas a priestor, v ktorých ich môžeme študovať. Avšak s rozvojom výpočtovej techniky sa aj tento nedostatok pomaly odstraňuje. (35)

Pre štúdium zložitých proteínových komplexov s lipidmi sa zanedbávajú jednotlivé interakcie na úrovni atómov. Tomuto prístupu hovoríme tzv. coarse-grained. Tento prístup umožňuje simulovať aktivitu membrány zloženej z desiatok tisíc lipidov a mnohých proteínov v čase milisekúnd. (36)

5.2.1 Molekulárna dynamika

Počítačová mikroskopia potrebuje pre svoje fungovanie simulačný algoritmus. Využíva teda simuláciu dynamiky molekúl. Pre simuláciu dynamiky molekúl je potrebné silové pole. Je to sada pravidiel, ktoré opisujú ako všetky atómy a molekuly interagujú. Ďalej je potrebný program pre vykonanie simulácie. Simulácia dynamiky molekúl využíva numerické riešenie Newtonovej rovnice pohybu:

$$F = m \cdot a \quad (5)$$

m	hmotnosť telesa
a	zrýchlenie
F	sila (33)

Pre skupinu častíc v danom čase sú dané počiatočné pozície, rýchlosti a pravidlá opisujúce interakcie molekúl, z ktorých môžeme vypočítať zrýchlenie a každej častice i v danom čase t . Ako druhé je možné predvídať nové pozície a rýchlosti všetkých častíc v ďalšom časovom momente $t + \Delta t$. Tento postup sa opakuje, aby sme získali časový vývoj systému. Existuje však veľa dôvodov prečo v praxi nie je možné presne simulovať interakcie a správanie sa systému v čase. Je to zanedbanie mnohých stupňov voľnosti. Stupňom voľnosti rozumieme vznik a zánik chemických väzieb, elektrónové polarizačné efekty a ďalšie. Rozhodnutie spriemerovať hodnoty týchto interakcií, závisí na celi pozorovania. Ďalej je to obmedzené množstvo vzorky kvôli správnej integrácii pohybových rovníc pre každú časticu. Simulácie prebiehajú oddelene v jednotlivých časových momentoch. Je preto dôležité vybrať dostatočne krátky úsek Δt pre správnu integráciu rovníc. Ďalším je správne silové pole. Presnosť, rýchlosť a dostupnosť molekúl s presnými parametrami sa pole od poľa značne líši. Typické je, že najpresnejšie silové pole je zároveň najpomalšie na výpočet, preto je dôležitý správny výber silového poľa najvhodnejšieho pre daný systém a experiment. Hranice študovaného úseku je potrebné ošetriť. Ostré rozhrania pozorovaného úseku sa odstránia tak, že molekuly na okraji úseku nenarazia na vákuum alebo pevnú hranicu ale na hranice kópie pozorovaného úseku. (33)

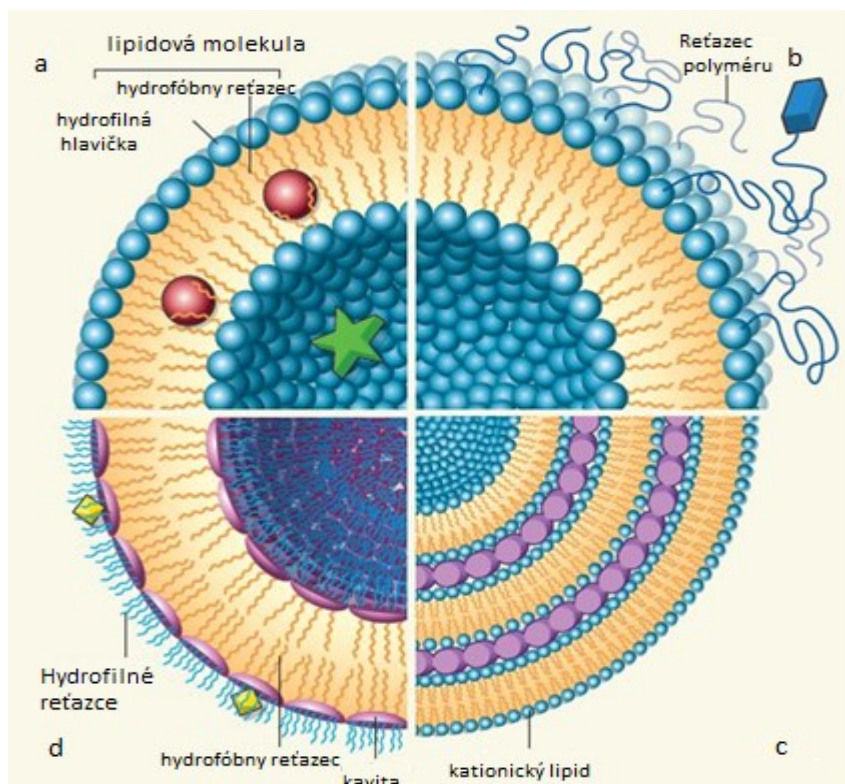
Po výbere parametrov simulácie sa systém organizuje charakterizáciou pozície všetkých častíc, ktoré budú pozorované. Vo východiskovej štruktúre je pred spustením simulácie minimalizovaná energia aby nedošlo k zaťaženiu systému. Simulácia sa následne spustí a prebieha, až kým systém nenazbiera dostatok údajov o pozorovanom jave a nepreskúma dostatočne veľkú časť vzorky. Zobrazenie simulácie nám umožnia rôzne počítačové programy. Najčastejšie využívaný je VMD (Visual Molecular Dynamics). (33)

6. VYUŽITIE BIOLOGICKÝCH MEMBRÁN PRE TERAPIU CHORÔB

6.1 *Lipozómy v terapii*

Lipozómy boli objavené náhodne pri výskume fosfolipidov v roku 1964. (37) Lipozómy sú sférické útvary zložené z fosfolipidovej dvojvrstvy. Svojim usporiadaním napodobňujú reálne bunkové membrány. Sú schopné prenosu hydrofóbných molekúl vnútri dvojvrstvy, ale aj hydrofilných molekúl vnútri kompartmentu, ktorý dvojvrstva spontánne vytvára. Toto vidíme na Obrázok 11 časť a. (38) Dnes sú lipozómy využívané hlavne v kozmetickom priemysle. Užitočné sú tiež pre štúdium funkcie izolovaných membránových proteínov, alebo interakcií viacerých proteínov v membráne. (39) Použitie lipozómov ako potencionálnych prenášačov liečiv je však limitované ich rýchlym odbúravaním z krvného riečiska za účasti imunitných buniek. Tomuto javu sa dá vyhnúť, ak je povrch lipozómu upravený kovalentnou väzbou polyméru rozpustného vo vode ako vidíme na Obrázok 11 časť b. Ďalšou úpravou polymérov, konkrétne naviazaním ligandu špecifického pre určitý receptor na cieľovej bunke môže lipozóm cielene prenášať liečivo až na miesto účinku. (38) Rovnako ako liečivá môže byť prenášaná DNA. Najčastejšie v kationických lipozómoch, ktoré môžu tvoriť multilamelárne štruktúry a prenášať DNA medzi fosfolipidovými dvojvrstvami. DNA interaguje s fosfolipidovými hlavičkami, ktoré sú nabité kladne pomocou elektrostatických väzieb ako vidíme na Obrázok 11 časť c. (40)

Kubitschke a kol. vytvorili útvary podobné lipozómom. Ich dvojvrstva sa skladá z molekúl v tvare misky, na ktorú sú naviazané hydrofilné aj hydrofóbne konce čím vzniká ich amfifilný charakter a schopnosť usporiadať sa do dvojvrstvy ako vidíme na Obrázok 11 časť d. Tieto špeciálne lipozómy môžu prenášať molekuly s rôznou veľkosťou. Molekuly nad 100 nm môžu byť uzavreté vnútri lipozómu. V hydrofóbnej vrstve sa môžu uchytiť molekuly s veľkosťou niekoľko nanometrov a molekuly s veľkosťou v angströmoch sú prenášané v hydrofóbných kavitách miskovitých molekúl. (41)

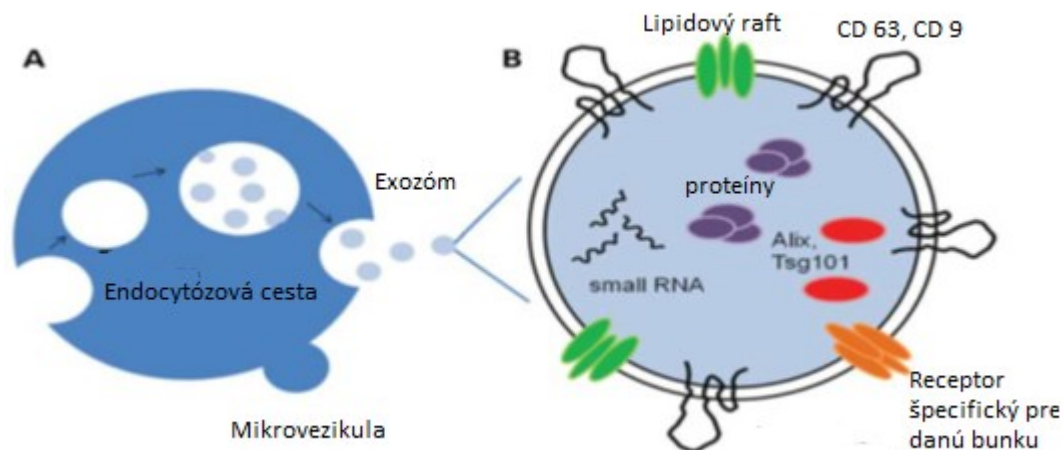


Obrázok 11: Spôsoby využitia lipozómov pre transport látok (38)

6.2 Extracelulárne vezikuly (EV)

EV sú dôležité pre transport látok medzi bunkami. Tento názov je spoločný pre široké spektrum vezikulov vytvorených z niekoľkých typov buniek. Medzi EV patria malé vezikuly zvané exozómy s veľkosťou 30-100 nm odvodené z endocytózovej cesty. Tiež tu patria mikrovezikuly rôznych veľkostí (od 50-1000 nm) tvorené pučaním plazmatickej membrány. Spôsob vzniku týchto vezikúl je znázornený na Obrázok 12 časť A. Zabezpečujú prenos genetickej informácie a peptidov. Podieľajú sa na rôznych procesoch, napríklad na komunikácii kmeňových buniek s poškodeným tkanivom, na regulácii imunitnej odpovede, ale aj na metastázovaní rakoviny a rozvoji neurodegeneratívnych chorôb. (42) EV môžu potencióálne slúžiť ako prenášače liečiv. (43) Pre tento účel slúžia aj exogénne pripravené EV tzv. lipozómy. EV môžeme nájsť v telesných tekutinách a v krvnom obeh. Časť EV je odbúravaná interakciou s tkanivami a ďalšia časť je systémovo odbúravaná z cirkulácie. Plazmatický polčas EV je odhadovaný na cca 2 min. Z pečene, sleziny a pľúc sú EV degradované pomalšie. (44)

Exozómy a mikrovezikuly môžeme odlíšiť na základe ich biofyzikálnych vlastností, povrchových proteínov, veľkosti a povrchových molekúl. Vyskytujú sa vo väčšine telesných tekutín napr. plazme, sére, moči, likvore atď. (45)



Obrázok 12: Časť A: spôsob vzniku extracelulárnych vezikúl. Časť B: detail zloženia exozómu. (45)

6.2.1 Fyziologická a patofyziologická funkcia EV

EV svojou existenciou prispievajú k udržaniu homeostázy organizmu. Okrem iných funkcií sú dôležité pre reguláciu imunitného systému. Nedávno vedci objavili exozómy izolované z materského mlieka, ktoré boli bohaté na microRNA (miRNA) regulujúcu imunitu a vývoj dieťaťa. Obsah exozómov z materského mlieka má potenciál ovplyvňovať cieľové gény v bunkách tráviaceho traktu novorodenca. (46) Na druhú stranu sa EV môžu podieľať aj na patologických procesoch. Napríklad mikrovezikuly uvoľnené z nádorových buniek pľúc majú potenciál stimulovať expresiu proangiogénnych faktorov a tak podporovať šírenie nádoru. (47)

EV sa tiež podieľajú na šírení neurodegeneratívnych chorôb ako sú Parkinsonova a Alzheimerova choroba. Ich funkcia spočíva v prenášaní určitého peptidového fragmentu pri Alzheimerovej chorobe a α -synukleínu pri Parkinsonovej chorobe. (48)

6.2.2 Zmena fenotypu bunky po prenose informácie mikrovezikulami

Dôkaz, že mikrovezikuly sú schopné prenosu genetickej informácie je zmena fenotypu bunky, ktorá túto informáciu prijala. Túto myšlienku začali vedci študovať po tom, čo bunky kostnej drene po kultivácii s bunkami pečene začali tvoriť mediátorovú RNA (mRNA) kódujúcu albumín. (49) Podobné výsledky získali po kultivácii poškodeného pľúcneho tkaniva s bunkami kostnej drene. Mikrovezikuly uvoľnené z pneumocytov navodili epigenetickú úpravu v bunkách kostnej drene. Po analýze prenosu tkanivovo špecifických mRNA, miRNA a proteínových transkripčných faktorov extracelulárnymi mikrovezikulami sa ukázalo navodenie zmeny fenotypu. Bunky kostnej drene vykazovali zmenu fenotypu na základe typu buniek, s ktorými boli kultivované. (45)

6.2.3 Extracelulárne vezikuly v terapii

V roku 2007 vedci izolovali mikrovezikuly z endotelových progenitorových buniek, ktoré obsahovali proangiogénnu miRNA (50). Prenos tejto miRNA aktivoval signálnu dráhu a endoteliálne bunky tak podstúpili angiogénny a antiapoptotický program. Zaujímavosťou je, že rovnaká miRNA v mikrovezikulách odvodených z endotelových progenitorových buniek bola schopná preprogramovať zbytkové hypoxické bunky obličiek k regenerácii a ochrániť ich tak pred ischemicko-reperfúznym poškodením alebo aktivovať angiogénny program na endoteliálnych ostrovcích pankreasu po ich transplantácii a tak zvyšovať účinnosť produkcie inzulínu. (51) Podobne mikrovezikuly odvodené z iných buniek ukázali svoj terapeutický potenciál v mnohých ďalších poškodeniach buniek. (45)

Alternatívny terapeutický prístup je nastaviť prirodzene sa vyskytujúce exozómy tak, aby mohli byť využité pre ciele genovú terapiu. Exozómy sa ukazujú ako ideálne vektory pre genetickú informáciu, pretože sú zložené z nesyntetických a nevírusových zložiek. Tiež ich malá veľkosť a dobrá flexibilita im umožňuje prechod cez veľké biologické membrány a uľahčuje tak transport k cieľu, zatiaľ čo ich dvojvrstvá lipidová štruktúra chráni RNA a ďalší obsah pred degradáciou. (52)

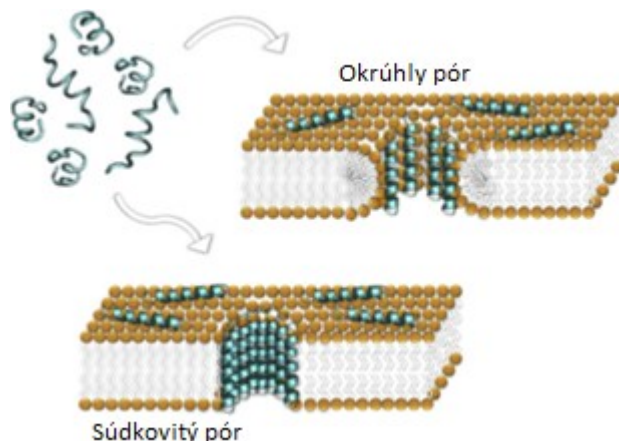
Tieto modifikované exozómy môžu byť podané opakovane bez nežiadúcej imunitnej odpovede. Tento fakt poukazuje na relatívne bezpečnú formu terapie. Tieto zistenia položili základy pre vývoj extracelulárnych vezikúl ako inteligentných vektorov pre ciele genovú terapiu a rozšírili repertoár terapeutických makromolekúl (oligonukleotidov a proteínov). (45)

6.3 Tvorba pórov v membráne

Transport látok cez membránu nemusí byť sprostredkovaný len proteínovými molekulami. Je to tiež vytvorenie hydrofilného póru z fosfolipidov, ktoré vedie k priepustnosti membrány pre vodu a v menšej miere aj pre ióny a iné hydrofilné molekuly. Zlyhanie kontroly prenosu látok cez membrány často zapríčiňuje bunkovú smrť. V medicíne je veľký záujem o metódy, ktoré prechodne prerušia integritu membrány. Teda metódy umožňujúce zvýšiť priepustnosť bunkovej membrány, a tak vniesť do vnútra bunky určité chemické zlúčeniny. (53) Doposiaľ najznámejšou technikou je použitie vonkajšieho elektrického poľa a nazýva sa elektropermeabilizácia. Táto metóda bola úspešne aplikovaná pre liečenie rakoviny v elektrochemoterapii. Selektívny a lokálny prenos cytotoxického lieku viedol k požadovanej bunkovej smrti. (54)

6.3.1 Tvorba pórov v membráne navodená antimikrobiálnymi peptidmi

Antimikrobiálne peptidy sú malé, zvyčajne kationické peptidy, ktoré majú schopnosť formovať póry v membránach. Poznáme zopár tvarov pórov. Dva najbežnejšie sú súdkovitý a okrúhly model ako môžeme vidieť na Obrázok 13. Štruktúra póru závisí na type antimikrobiálneho peptidu, ktorý formuje daný pór. Napríklad magainín a melittín formujú okrúhly pór. Naopak alamethicín tvorí súdkovitý pór. (55)



Obrázok 13: Modelové tvary membránových pórov. (53)

Vyššie na obrázku je okrúhly pór tvorený peptidmi aj fosfolipidovými hlavičkami. Nižšie je pór súdkovitý, tvorený len antimikrobiálnymi peptidmi. (53)

Tvorba pórov v membráne závisí na pomere koncentrácie peptidu k lipidom. Nad určitú koncentráciu antimikrobiálnych peptidov v blízkosti membrány sa tieto peptidy začnú adsorbovať na povrch lipidovej dvojvrstvy a agregovať. Následne sa jeden z adsorbovaných peptidov (napr. magainín) vmedzerí hlboko do membrány a ostatné sa usporiadajú paralelne s membránou a vytvoria tak neusporiadaný okrúhly pór ako vidíme na Obrázok 13. Pri nižších koncentráciách peptidov sa pór vytvorí, ale pomalšie. (56)

Ukázalo sa, že zvýšená koncentrácia peptidov v systéme vedie k zvýšeniu výkyvov v hrúbke membrány. Tieto výkyvy pochádzajú z výčnelkov peptidov viažúcich sa k monovrstve a predpokladá sa, že pomáhajú prekonať energetickú bariéru pri tvorbe pórov v membráne. Ďalšie štúdie ukazujú, že adsorpcia peptidu spôsobuje zväčšenie plochy pripadajúcej na lipid a tým stenčenie membrány. Takéto stenčenie zníži bariéru voľnej energie pre flip-flop lipidov cez membránu. Zníženie voľnej energie spolu s vložením N-konca antimikrobiálneho peptidu do poškodenej membrány, stabilizuje poškodenie a vytvorí sa pór s priemerom 1,5 nm. (57) Peptidy sú vo vodnom prostredí často neorganizované a získavajú štruktúru α -helixu po väzbe k membránam. Sekundárna štruktúra peptidu sa teda ukázala ako nepodstatný faktor počas tvorby pórov. Zmena nabitých arginínových zbytkov na nenabité glutamínové viedla

k rozrušeniu stabilných pórov. Odstránenie kladného náboja peptidu tak spomaľuje tvorbu pórov. (53)

Tvorba pórov antimikrobiálnymi peptidmi má niektoré znaky spoločné. Prvý je, že model neusporiadaného póru sa vyskytuje častejšie. Po druhé, že sekundárna štruktúra peptidu nie je dôležitá pri spustení formovania pórov. Ďalší je, že potrebujeme dostatočnú koncentráciu peptidu a nakoniec je to prítomnosť kladného náboja na peptide, ktorá výrazne prispieva k tvorbe pórov. (53)

6.3.2 Tvorba pórov v membráne navodená fosfolipidmi

Peroxidácia zmení fosfolipidové uhľovodíkové reťazce na hydrofilnejšie a tie následne môžu zmeniť vlastnosti biologickej membrány. Napríklad jej fluiditu a permeabilitu. Lipidy s esterovou skupinou v ich hydrofóbnom reťazci preukazujú istú podobnosť s peroxidovanými lipidmi. Takto upravené lipidy majú sklon k agregácii vo fosfolipidových dvojvrstvách, čím minimalizujú kontakt medzi hydrofóbnymi reťazcami a hydrofilnými časťami uhľovodíkových reťazcov. Schopnosť takto upravených fosfolipidov vytvárať póry v membránach bola dokázaná pomocou výpočtovej techniky. Tvorba hydrofilných pórov indukovaných lipidmi ukázala závislosť na umiestnení esterovej modifikácie v hydrofóbnom reťazci. Lipidy s esterovými skupinami v blízkom kontakte s hlavičkami fosfolipidov neumožňujú tvorbu pórov. (58)

Oxidované fosfolipidy sú štiepené v uhľovodíkovom reťazci na mieste dvojitej väzby. Na oboch vzniknutých koncoch potom nesú aldehydové skupiny. Štiepením hydrofóbného reťazca fosfolipidov vznikne fosfolipid so skráteným reťazcom a malá molekula ako zbytok reťazca. Tieto modifikované lipidy sú následne zapojené do peroxidácie lipidov, oxidatívneho stresu a zápalových reakcií. Reorientácia oxidovaných lipidových reťazcov nakoniec môže viesť k vniknutiu vody a vytvoreniu membránových pórov, ktoré môžu ohroziť bariérové funkcie membrány. (58)

6.3.3 Význam tvorby pórov v membránach

Pochopenie procesu formovania a uzatvárania pórov je kľúčové pre rozvoj nových medicínskych prístupov, ktoré umožňujú riadenú modifikáciu obsahu bunky a ak je potrebné aj bunkovú smrť. Simulácia dynamiky molekúl sa ukázala ako spoľahlivá metóda pre objasnenie mechanizmu tvorby pórov v membránach na molekulárnej úrovni. (53)

7. VYUŽITIE INTRACELULÁRNEHO TRANSPORTU PRE CIELENÚ TERAPIU

Cielená terapia je momentálne jeden z najviac študovaných problémov modernej biomedicíny. Za posledné roky sa venovala pozornosť dopraveniu liečivej látky nielen do cieľovej bunky, ale tiež do jej špecifického kompartmentu. Ak látka nie je špecifická pre požadovaný vnútrobunkový kompartment, musí byť dostatočne stabilná, aby sa dostala do požadovaného kompartmentu náhodnými prenášačovými procesmi bez degradácie. Druhou možnosťou je úprava vlastností tejto látky tak, aby umožňovala jej priamu dopravu do určitého kompartmentu. (59)

Pri pokusoch využiť prvý spôsob cielennej terapie vznikli látky schopné dostať sa do kyslého prostredia endocytózových kompartmentov vďaka ich fyzikálnochemickým vlastnostiam. (60)

Obdobné výsledky môžeme získať aj použitím druhého spôsobu. Pri ňom využívame receptormi sprostredkovanú endocytózu. Tento spôsob využíva prirodzené vnútrobunkové cesty pre cielenú terapiu a uľahčuje kombinovanie dvoch očividne odlišných komplexov znakov. Tieto komplexy v liečive samotnom alebo v jeho prenášačovom komplexe umožňujú rozpoznanie cieľových buniek a vyššiu účinnosť dopravy liečiv. Rozpoznanie môže byť realizované na základe špecifických znakov na bunkovom povrchu a vyššia účinnosť je zabezpečená prienikom liečiva do bunky a ďalej do jej konkrétneho kompartmentu. (61)

7.1 Spôsoby vniknutia látky do bunkových kompartmentov

Látka neschopná preniknúť cez membránu sa vnútri bunky môže vyskytnúť pinocytózou alebo vďaka pripojeniu k špeciálne vyvinutým prenášačom, ktoré sú schopné buď preniknúť cez plazmatickú membránu alebo sú schopné použiť prirodzené mechanizmy endocytózy a fagocytózy umožňujúce látke špecificky vniknúť do bunky. Prijem látky bunkou pomocou pinocytózy nemôže poskytnúť akumuláciu podaného liečiva v koncentráciách vyšších, ako je jeho koncentrácia vo vonkajšom médiu. Pre priamy prienik liečiva cez membránu boli navrhnuté membránu penetrujúce peptidy CPP (cell penetrating peptides). Spojená štruktúra liečiva a CPP však súčasne podlieha výraznej nešpecifickej endocytóze sprevádzanej následným viac alebo menej efektívnym prienikom cez membránu endozómu. Tento spôsob môžeme definovať ako nešpecifický a efekt získame po saturácii celého organizmu komplexom liečiva s CPP. (62)

Preto je vhodnejšie použiť aktívny transport do cieľových buniek použitím povrchových receptorov a vnútrobunkovej dopravy. V dôsledku použitia tohto spôsobu je nutné zahrnúť do prenášačov komponenty schopné rozpoznať cieľovú bunku. Tým je

napríklad ligand naviazaný na danom prenášači. Prenášač prijatý endocytózou závislý na receptore a type endocytózy, môže byť vrátený späť na bunkový povrch vďaka prirodzenému obehu alebo sa môže vyskytnúť v neskorých endozómoch a potom v lyzozómoch. Prenášače s aktívnou látkou tiež môžu byť nacielené do ER alebo GA prostredníctvom triedenia a vezikulárneho transportu. Aby sme toto nacielenie dosiahli je vyžadovaná prídavná komponenta na liečivo alebo jeho prenášači s funkciou zacielenia na určitý kompartment. Táto komponenta nesúvisí s prenosom cez membránu a látka, ktorá má byť dopravená na určité miesto zostáva na rovnakej strane plazmatickej membrány ako extracelulárny priestor. Pre prenos do ďalších bunkových kompartmentov (jadra, mitochondrie...) je nutný prenos cez lipidovú dvojvrstvu (endozómov, ER...) alebo cez dvojitú lipidovú dvojvrstvu (do jadra cez jadrové póry, do mitochondrií cez translokačné komplexy). Pre prenos liečiv do týchto kompartmentov zvonku nestačí len prídavná komponenta s funkciou zacielenia pre daný kompartment. Pre efektívne preniknutie do daného kompartmentu je vyžadované pridanie zodpovedajúceho modulu, ktorý zacielené liečivo prenesie z povrchu do vnútra cieľového kompartmentu. Preto jednoduché pridanie lokalizačného signálu pre jadro do prenášača obsahujúceho liečivo nie je dostatočné pre efektívnu dopravu do jadra. (63)

7.2 Použitie receptormi sprostredkovanej endocytózy

Niektoré liečiva preferenčne účinkujú v určitých bunkových kompartmentoch, a preto musia byť dopravené do ich vnútrobunkových cieľových štruktúr. V bunke môže byť cieľová štruktúra pre rôzne liečivá rôzna. Napríklad cieľovou štruktúrou pre DNA je jadro alebo pre preapoptotické enzýmy sú to mitochondrie. Nevyhnutným krokom dopravenia do zodpovedajúcej cieľovej štruktúry je preniknutie do bunky. Väčšina liečiv používaných v klinickej praxi môže prenikať cez membránu samostatne pasívnou difúziou alebo použitím membránových prenášačov. Avšak veľa liečiv navrhnutých pre cielenú liečbu nemôže preniknúť cez membránu bez úpravy kvôli ich veľkosti alebo náboju. Alebo prenikajú len s veľmi malou účinnosťou. Cielená doprava takýchto liečiv musí zahŕňať nielen rozpoznanie cieľovej bunky, ale aj prienik do nich. Prienik sa väčšinou zabezpečuje receptormi sprostredkovanou endocytózou alebo menej často uložením liečiva do membránovo aktívneho peptidu schopného vytvoriť póry v bunkovej membráne. (63)

Myšlienka využitia receptorov na povrchu membrány pre prenos liečiv do cieľových buniek je známa už od 80. rokov 20. storočia, keď mnohé štúdie odhalili prítomnosť rôznych receptorov na povrchu nádorových buniek, ktoré však na zdravých bunkách chýbali alebo ich bolo len veľmi malé množstvo. Špecifické receptory na nádorových bunkách sú ich znakmi, ktoré môžeme detegovať pomocou protilátok alebo špecifických ligandov. (64)

Ak sa tieto receptory nenachádzajú len na povrchu bunky, ale aj v jej vnútri, môžu byť tieto molekuly využité nielen pre doručenie liečiva na povrch povrch buniek, ale aj do ich vnútra pomocou receptormi indukovanej endocytózy. Receptormi sprostredkovaná endocytóza môže byť využitá aj pre liečbu iných chorôb, pretože expresia mnohých receptorov sa výrazne líši aj u jednotlivých typov zdravých buniek organizmu. (65)

Najčastejšie využívané ligandy pre vývoj cielenej terapie (najmä pre nádorové bunky) sú transferínové receptory pre prenos doxorubicínu, hydroxykamptotecínu a oxaliplatiny, epidermálny rastový faktor pre prenos cisplatiny, somatostatín pre prenos paklitaxelu, doxorubicínu a mnoho ďalších. Použitie receptormi sprostredkovanej endocytózy pre prenos liečiva do bunky môže výrazne zlepšiť jeho liečebný efekt. Avšak, vnútrobunková distribúcia po endocytóze je neoptimálna pre liečivá účinkujúce v jadre, mitochondriách a základnej hmote bunkovej cytoplazmy tzv. hyaloplazmy. Okrem toho, prirodzené cesty dopravy látok zakomponujú liečivo do endocytózového kompartmentu odkiaľ je veľa liečiv eliminovaných z bunky von. Alebo procesom endocytózy sú liečivá po splynutí s lyzozómami enzymaticky štiepené. Štruktúra prenášajúca liečivo preto musí opustiť prirodzené cesty príjmu látok bunkou. Aby bola tohto manévru schopná musí obsahovať určitú prídavnú komponentu, ktorá jej tento únik z endocytózovej cesty zabezpečí. (63)

7.2.1 Transport liečiva do lyzozómov

V prípade lyzozomálnych enzýmov, ktoré majú byť doručené do lyzozómov nemusíme opúšťať endocytózový kompartment. Pre ich transport a zacielenie využívame lipozómy upravené lyzozóm tropným oktadecyl-rhodamínom B na ich povrchu. Tiež je známe, že únik lyzozomálnych enzýmov navodzuje apoptózu bunky, preto mnohé cielené terapie rakoviny využívajú dopravu rôznych látok poškodzujúcich membránu lyzozómu cielené do lyzozómu. (66)

7.2.2 Transport liečiva do hyaloplazmy

Avšak, pre cielenú terapiu liečiv do hyaloplazmy, jadra alebo mitochondrií musí byť prenášač liečiva schopný opustiť endocytózový kompartment predtým, než dôjde k degradácii liečiva v lyzozómoch. (63)

Bakteriálny toxín alebo poškodený proteín využíva pre únik zo systému transportných vezikulov (endozómy, lyzozómy, GA, ER) prirodzenú retrográdnú cestu do hyaloplazmy (tzv. ERAD). (67) Proteíny, ktoré počas svojho vzniku zaujali nesprávnu konformáciu sú v ER zachytené pomocou ERAD (endoplasmic-reticulum associated degradation), čo je teda degradácia proteínov asociovaná s ER. Následne sú presunuté do cytozolu, kde môžu byť ďalej odbúravané proteazómom. Translokáciu cez

membránu ER zabezpečuje prenášač zvaný Sec61 komplex. (68) Pre pohyb toxínu po retrográdnej ceste je dôležitá jeho väzba na špeciálny receptor na povrchu bunky. Tieto receptory sa veľmi často vyskytujú na nádorových bunkách, a preto sa podjednotky toxínov zodpovedné za väzbu na špeciálny receptor umožňujúci retrográdnú cestu pripájajú k liečivám. Tak je zaistený ich transport do hyaloplazmy. Tento spôsob prenosu je však využívaný len zriedkavo. (69) Viac využívaný spôsob opustenia endocytózového kompartmentu je zníženie pH vnútri kompartmentu, rozrušenie membrány a následné uvoľnenie liečiva do hyaloplazmy. Prirodzenú schopnosť znížiť pH vnútri kompartmentu majú adenovírusy. (70)

8. VÝZNAM RAFTOVÝCH DOMÉN

Raftová doména je malý úsek (mikrodoména) biologickej membrány s vyšším zastúpením sfingolipidov, cholesterolu a proteínov. Raftové domény sú prirodzenou súčasťou biologických membrán. Majú viacero funkcií. Hrajú úlohu pri prenose signálu, intracelulárnej signalizácii a vezikulárnom transporte. Tiež slúžia ako miesta v membráne pre upevnenie cytoskeletu. (71)

Membrány organel tvoria akési rozhranie medzi lumen organely a okolitou cytoplazmou. Dôkladná segregácia membránových proteínov a lipidov je nevyhnutná pre udržanie identity danej organely. Molekulárna identita, čiže špecifické zastúpenie lipidov a proteínov, určuje funkciu daného kompartmentu ako celku. Toto rozdelenie musí byť napriek rozsiahlej a rýchlej výmene častí membrány medzi kompartmentmi konštantné. Sú preto potrebné vysoko účinné a presné triediace procesy, aby sa zabránilo nesprávnemu zaradeniu komponent membrány a udržalo sa tak správne fungovanie bunky. (72)

Golgiho aparát je hlavným miestom triedenia proteínov do membrán jednotlivých kompartmentov. Trans strana GA tzv. trans-Golgi network (TGN) je miestom odkiaľ sú selektívne vyberané komponenty membrán pre ich ďalší transport do ich cieľovej bunkovej štruktúry. Pre určité komponenty membrány je transport z GA jednoznačný, avšak zložitejšia situácia nastáva v polarizovaných bunkách, ako sú napr. bunky epitelové. (72)

Apikálna membrána polarizovaných buniek sa nelíši len v zložení proteínov, ale aj v zložení lipidov. Nachádzajú sa tu najmä glykozylované sfingolipidy a cholesterol s relatívnym úbytkom glycerofosfolipidov. Rovnaký povrch ako na apikálnej alebo bazolaterálnej strane polarizovanej bunky bol pozorovaný na vezikulách pochádzajúcich z TGN, ktoré obsahovali buď apikálne alebo bazolaterálne komponenty membrány. Pre vysvetlenie týchto javov používame model založený na sfingolipidoch, ktoré sú spojené vnútromembránovými vodíkovými väzbami. Tento model predpokladá, že lipidy a proteíny sa oddelia do mikrodomén, ktoré majú podobné

zloženie ako ich cieľový kompartment. (72) K overeniu tohto modelu došlo spolu s pozorovaním, že mikrodomény určené pre apikálnu stranu membrány môžu byť špecificky izolované na základe ich rezistencie na neiónový detergent (najčastejšie Triton X-100) a tiež, že neskôr v sekrečnej dráhe (TGN) získajú nerozpustnosť. Útržky týchto membrán rezistentných na detergent (DRMs detergent- resistant membranes) boli tiež pozorované v transporte smerovanom k plazmatickej membráne (PM) v nepolarizovaných bunkách. Celky obohatené o glykosfingolipidy sú teda všeobecným znakom triedenia komponent membrány z TGN na PM. (73) Tieto pozorovania spolu so štúdiom bunkovej biológie a biofyzikálnymi pozorovaniami syntetických modelov membrán objasňujú fyzikálno-chemický mechanizmus, ktorým mikrodomény membrán bohaté na glykozylované sfingolipidy a cholesterol umožňujú triedenie komponent membrán (lipidov a proteínov) do jednotlivých bunkových kompartmentov. (74)

9. MEMBRÁNY A CHOROBY

9.1 Alzheimerova choroba

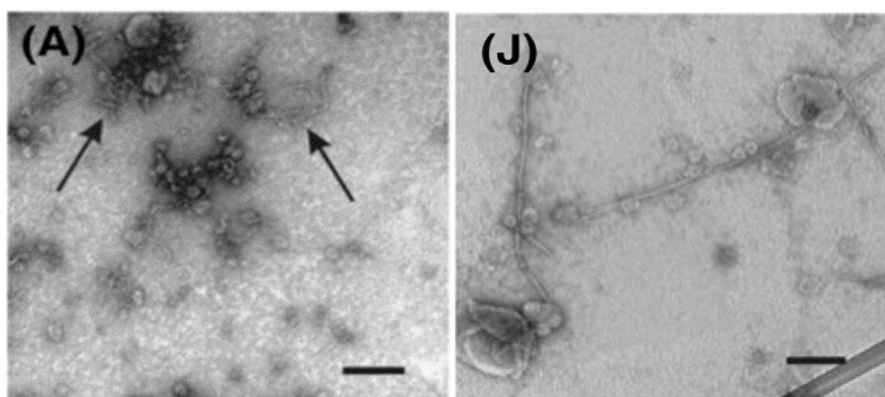
Jedným z kľúčových klinických príznakov pre diagnózu Alzheimerovej choroby je akumulácia extracelulárneho β amyloidného plaku okolo neurónov. (75) Základnými stavebnými zložkami týchto plakov sú vlákna β amyloidu (ďalej len A β), ktoré vznikajú agregáciou peptidov A β . Tieto peptidy sú zvyškami enzymatického štiepenia segmentov veľkého s membránou asociovaného amyloidného prekursorového proteínu (tzv. amyloid precursor protein, APP). Po štiepení mohol byť peptid čiastočne vložený do membrány a následne byť vylúčený z membrány do extracelulárneho prostredia. Presný mechanizmus vylúčenia A β z membrány nie je dokonale známy, ale významný efekt spočíva v celkovom množstve cholesterolu, ako aj jeho distribúcii v membráne. Ďalej peptidy A β viac interagujú s negatívne nabitými fosfolipidmi. Fluidita plazmatickej membrány živých buniek je znížená po interakcii s oligomérnymi druhmi A β viac ako s monomérnymi alebo vláknitými druhmi A β . Po vylúčení peptidu môže začať agregácia A β , ktorá vedie k formovaniu vlákien. Proces zvlákňovania môže navodiť narušenie lipidovej dvojvrstvy. Tento proces bol navrhnutý ako jeden z mechanizmov neurotoxicity A β . (76)

Avšak, ak sú peptidy A β schopné včleniť sa do membrány, je pravdepodobné, že sa môžu stať súčasťou endozómov. (77)

Kvôli komplexnosti systému A β s membránou nie je molekulárny mechanizmus ich vzájomnej interakcie dobre preskúmaný. Mechanizmus zahŕňa štrukturálnu evolúciu A β z monomérnych peptidov do vláknitých druhov a rozrušenie membrány počas procesu zvlákňovania. Vo svojom experimente Wei Qiang a kol. použili transmisnú elektrónovú mikroskopiu (TEM) pre sledovanie morfológického vývoja zvlákňovania A β . Solid state NMR (nuclear magnetic resonance) bola použitá pre sledovanie molekulárnej štruktúry A β ako aj pre zmeny štruktúry membrány. (78)

Vývoj morfológie vlákien A β a poškodenie lipozómov

Pre vzorku, kde bol A β preinkorporovaný do dvojvrstvy lipozómu zaznamenala TEM spočiatku inkubácie tvorbu krátkych oblých protofibril ako môžeme vidieť na Obrázok 14 časť (A). V čase ich dĺžka narastala, ale ich oblý tvar pretrvával. Morfológia lipozómov sa však zdala byť porušená už od začiatku zvlákňovania A β peptidov, kedy dochádza k rozpadu lipozómov. Pre vzorku s vonkajším pridaním A β peptidu na Obrázok 14 časť (J) bolo badateľné formovanie dlhých rovných vlákien. Morfológia lipozómov sa na rozdiel od preinkorporovanej vzorky počas zvlákňovania neporušila. (78)

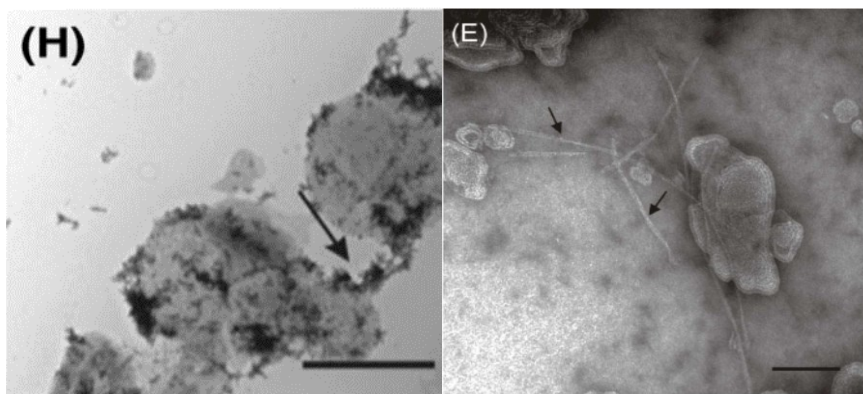


Obrázok 14: Zvlákňovanie A β za rôznych podmienok (78)

V časti (A) je A β vložený do štruktúry membrány lipozómu počas tvorby lipozómu. Šípky ukazujú na vlákna A β . V časti (J) je znázornený A β externe pridaný ku vytvorenému lipozómu. Mierka znázorňuje 100 nm. (78)

Zdá sa, že proces zvlákňovania bol tiež ovplyvnený rozdielnym fosfolipidovým zložením lipozómov. Na Obrázok 15 časť (H) vidíme lipozómy zložené z fosfatidylcholínu, fosfatidylglycerolu a cholesterolu. Na Obrázok 15 časť (E) vidíme lipozómy zložené z fosfatidylcholínu. Tieto rozdiely ukázali, že kinetika formovania vlákien bola ovplyvnená zložením membrány podľa všetkého spojeného s lokálnymi zmenami koncentrácie A β . V predošlých štúdiách boli A β agregáty viac koncentrované

v membráne, kde sa cholesterol vyskytoval vo zvýšenej koncentrácii a absorbcia A β na lipozóm sa zvýšila v prítomnosti záporne nabitých fosfolipidov. (79) (80)



Obrázok 15: Ovplynenie zvlákňovania A β rôznym zastúpením fosfolipidov v membráne lipozómov (78)

V časti (H) je štádium zvlákňovania A β , kedy sú oligoméry A β sférického tvaru a adsorbujú sa na povrch lipozómu. Časť (E) znázorňuje, že počas celého procesu zvlákňovania sú všetky štádia A β (monoméry, oligoméry, protofibrily aj zrelé vlákna) rovné a vlákňité. (78)

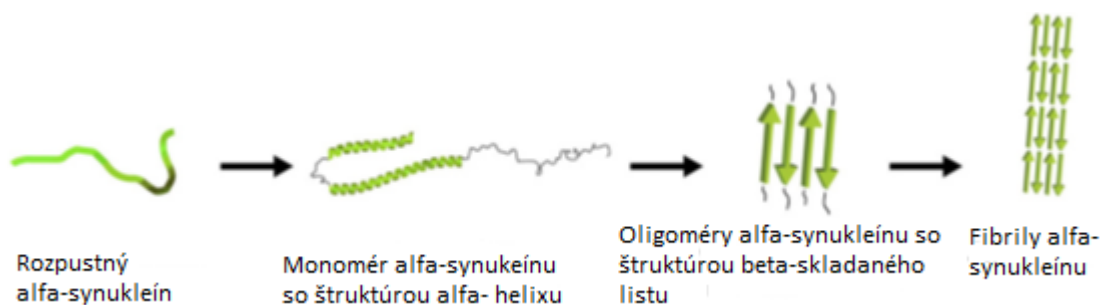
Výsledky tejto štúdie ukázali, že spôsoby zvlákňovania A β boli silno ovplyvnené počiatočným štádiom peptidov v membránových systémoch. Teda, či bola vzorka pripravená s externým pridaním alebo priamou inkorporáciou peptidu A β . Tieto dva modely môžu slúžiť ako napodobnenie pre biologický scenár extracelulárneho formovania A β . Membránová deštrukcia bola navodená počiatočnými zmenami štruktúry peptidov asociovaných s membránou. Predlžovanie hotových vlákien malo menší efekt na integritu membrány lipozómov. (78)

9.2 Význam kardiolípinu pri vzniku Parkinsonovej choroby

Jedna z príčin Parkinsonovej choroby je nesprávne zloženie a následná agregácia patologického proteínu α -synukleínu do väčších oligomérov, ktoré sú zodpovedné za degeneráciu neurónov. Proces agregácie α -synukleínu je znázornený na Obrázok 16. Neurotoxita oligomérov α -synukleínu súvisí s ich schopnosťou včleniť sa do biologickej membrány a rozrušiť ju. Zvlášť bývajú postihnuté membrány s negatívne nabitým povrchom. Dôsledky interakcie membrány a α -synukleínu sú zvýšené napnutie membrány, zvýšená priepustnosť formovaním pórov a nakoniec rozpad membrány. Predpokladá sa, že α -synukleín interaguje s CL, ktorý pomáha α -synukleínu začleniť sa aj do vnútornej membrány mitochondrií a neskôr tak vyvolať apoptózu. (81)

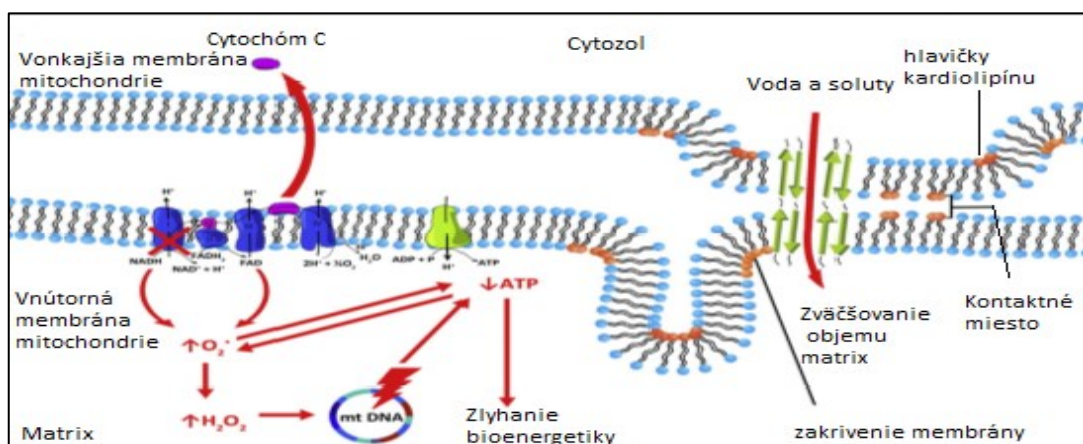
Najväčší rozdiel v prebytku fosfolipidov medzi vonkajšou a vnútornou mitochondriálnou membránou je v CL. Vonkajšia membrána obsahuje 5% CL a vnútorná 20% CL. (82)

CL ovplyvňuje rôzne biofyzikálne vlastnosti fosfolipidovej membrány. CL pravdepodobne rozrušuje mechanickú stabilitu membrány. Jeho acylové reťazce navodzujú zakrivenie v raftoch, ako aj v kristách vnútornej mitochondriálnej membrány. Taktiež môže niesť dva záporné náboje. Tieto tri vlastnosti CL ukazujú, že primárnym miestom pre poškodenie mitochondriálnej membrány patologickým oligomérom α -synukleínu sú miesta s CL. (81)



Obrázok 16: Agregačný proces α -synukleínu (81)

Bežne sa α -synukleín vyskytuje vo svojej monomérnej vnútorne neusporiadanej štruktúre. Po interakcii so záporne nabitou membránou N-koniec α -synukleínu získava štruktúru α -helixu. Miestne zvýšenie koncentrácie monomérov asociovaných s membránou umožňuje ich ďalšie usporiadanie do dimérov a oligomérov so štruktúrou β -skladaného listu. Predpokladaný mechanizmus neurotoxicity zahŕňa permeabilizáciu membrán buniek a organel pomocou oligomérov α -synukleínu, ktoré majú schopnosť vytvárať v membránach póry. Ďalšími interakciami medzi oligomérmi vznikajú fibrily α -synukleínu, ktoré v parenchýme mozgu vytvárajú tzv. Lewyho telieska. (81)



Obrázok 17: Poškodenie mitochondriálnej membrány oligomérmi α -synukleínu (81)

α -synukleín navodí poškodenie membrán mitochondrie v tzv. kontaktnom mieste ako vidíme na Obrázok 17. Kontaktné miesta sú charakteristické vyšším obsahom kardiopolipínu. Oligoméry α -synukleínu vytvoria naprieč vonkajšou aj vnútornou membránou mitochondrií hydrofilný kanál priepustný pre vodu. V dôsledku

preniknutia vody do mitochondrie sa zväčšuje objem mitochondriálnej matrix a dochádza k poškodeniu mitochondriálnych krist. Následne sa z vnútornej membrány uvoľňuje cytochróm c, ktorý ďalej preniká do cytozolu a tam navodzuje apoptózu bunky. (81)

10. ZÁVER

Táto práca mala za cieľ objasniť základnú štruktúru a funkciu biologických membrán, ktoré sú esenciálnou súčasťou živého organizmu. Taktiež sa venovala jednotlivým bunkovým kompartmentom a transportu látok cez biologické membrány.

V úvode práce je popísané zloženie, štruktúra a funkcia membrán. V ďalšej časti práce boli objasnené základné typy transportu cez membrány a uvedené niektoré príklady bunkových kompartmentov. Ďalej sa venovala moderným metódam pre štúdium biologických membrán napr. mikroskopii atómových síl alebo počítačovej mikroskopii.

Útvary zvané lipozómy a extracelulárne vezikuly predstavujú sľubné prenášače liečiv spolu s antimikrobiálnymi peptidmi som ich popísala v kapitole 6. Receptormi sprostredkovaná endocytóza využitá pre cielenú terapiu je popísaná v kapitole 7. Dôležitý význam pre správnu funkciu daného kompartmentu alebo úseku plazmatickej membrány majú význam raftové domény.

V závere práce je objasnený význam biologických membrán pri vzniku Alzheimerovej a Parkinsonovej choroby. Téma biologické membrány je veľmi rozsiahla a preto som sa zamerala len na určité poznatky o týchto štruktúrach, ktoré ma najviac zaujali.

11. POUŽITÉ SKRATKY

Skratka	význam skratky	slovenský význam
AFM	<i>Atomic Force Microscopy</i>	Mikroskopia atómových síl
APP	<i>Amyloid precursor protein</i>	Amyloidný prekursorový proteín
ATP	<i>Adenosinetriphosphate</i>	Adenosín trifosfát
A β	<i>Amyloid β</i>	Amyloid β
cAMP	<i>Cyclic adenosinmonophosphate</i>	Cyklický adenosín monofosfát
cGMP	<i>Cyclic guanosinemonophosphate</i>	Cyklický guanozín monofosfát
CL	<i>Cardiolipin</i>	Kardiolipín
COP	<i>Coating proteins</i>	Plášťové proteíny
CPP	<i>Cell penetrating peptides</i>	Peptidy prenikajúce bunkovou membránou
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>	Deoxyribonukleová kyselina
DRMs	<i>Detergent resistant membranes</i>	Membrány odolné voči účinku detergentu
ER	<i>Endoplasmic reticulum</i>	Endoplazmatické retikulum
ERAD	<i>Endoplasmic-reticulum associated degradation</i>	Degradácia spojená s endoplazmatickým retikulom
EV	<i>Extracellular vesicles</i>	Mimobunkové vezikuly
FADH ₂	<i>Flavin adenine dinucleotide</i>	Redukovaný flavín adenín dinukleotid
GA	<i>Golgi apparatus</i>	Golgiho aparát
GTP	<i>Guanosinetriphosphate</i>	Guanozín trifosfát
miRNA	<i>microRNA</i>	mikroRNA
mRNA	<i>Mediator ribonucleic acid</i>	Mediátorová Ribonukleová kyselina
NADH+H ⁺	<i>Nicotinamine adenosine dinucleotid</i>	Redukovaný nikotínamid adenín dinukleotid
NMR	<i>Nuclear magnetic resonance</i>	Nukleárna magnetická rezonancia
NSF	<i>N-ethylmaleimide Sensitive Fusion</i>	Fúzia citlivá na N-ethylmaleimid
PM	<i>Plasma membrane</i>	Cytoplazmatická membrána
t-SNARE	<i>Target soluble NSF Attachment Protein Receptors</i>	Cieľové rozpustné prichytávacie receptorové proteíny

TEM	<i>Transmission electron microscopy</i>	Transmisná elektrónová mikroskopia
TGN	<i>Trans-Golgi network</i>	Trans-Golgiho sieť
v-SNARE	<i>Vesicle-soluble NSF Attachment Protein Receptors</i>	Vezikulové rozpustné prichytávacie receptorové proteíny
VMD	<i>Visual molecular dynamics</i>	Vizualizácia molekulárnej dynamiky

12. ZOZNAM OBRÁZKOV

Obrázok 1: Štruktúra glycerolfosfolipidu (4)	8
Obrázok 2: Príklad štruktúry sfingolipidu (sfingomyelín) (4)	9
Obrázok 3: Štruktúra biologickej membrány (7)	11
Obrázok 4: Pohyby fosfolipidov vo fosfolipidovej dvojvrstve (8).....	13
Obrázok 5: Základné typy membránových receptorov (15)	16
Obrázok 6: Multienzymový komplex dýchacieho reťazca s ATP-ázou (16).....	18
Obrázok 7: Niektoré typy aktívneho transportu (21).....	21
Obrázok 8: Niektoré typy transportu látok v membránovom kontinuu (22)	23
Obrázok 9: Cieľený transport medzi organelami vnútri bunky (23).....	24
Obrázok 10: Princíp mikroskopie atómových síl (24).....	27
Obrázok 11:Spôsoby využitia lipozómov pre transport látok (38).....	32
Obrázok 12: Časť A: spôsob vzniku extracelulárnych vezikúl. Časť B: detail zloženia exozómu. (45)	33
Obrázok 13: Modelové tvary membránových pórov. (53).....	35
Obrázok 14:Zvlákňovanie A β za rôznych podmienok (78).....	42
Obrázok 15: Ovplyvnenie zvlákňovania A β rôznym zastúpením fosfolipidov v membráne lipozómov (78)	43
Obrázok 16: Agregáčny proces α -synukleínu (81)	44
Obrázok 17: Poškodenie mitochondriálnej membrány oligomérmi α -synukleínu (81).....	44

13. POUŽITÁ LITERATÚRA

1. **Vodrážka Z.** *Biochemie*. 2. vyd. Praha : Academia, 2007. s. 28-33, 111-115. ISBN 978-80-200-0600-4.
2. **Matouš B., Bubnová E., Buděšínská A. a kol.** *Základy lékařské chemie a biochemie*. 1. vyd. Praha : Galén, 2010. s. 59-63, 354,355. ISBN 978-80-7262-702-8.
3. **Murray Robert K., Granner Daryl K., Mayes Peter A. a kol.** *Harperova biochemie*. 4. vyd. Jinočany : H & H, 2002. s. 153,154. ISBN 80-7319-013-3.
4. **Anonymous.** *Složené lipidy*. [Online] [Datum: 29. 4. 2017.] Dostupné z: http://web2.mendelu.cz/af_291_projekty2/vseo/print.php?page=1530&typ=html.
5. **Kodíček M., Karpenko V.** *Biofysikální chemie*. 3. vyd. Praha : Academia, 2013. s. 250-286. ISBN 978-80-200-2241-7.
6. **Alberts B., Bray D., Johnson A. a kol.** *Základy buněčné biologie*. 2. vyd. Ústí nad Labem : Espero Publishing, 1998. s. 347-403. ISBN 80-902906-2-0.
7. **Kodíček M.** *membrána biologická*. [Online] [Datum: 23. 3. 2017.] Dostupné z: http://147.33.74.135/knihy/uid_es-002_v1/hesla/membrana_biologicka.html.
8. **Anjali S.** *Plasma membrane: Meaning, Structure and Molecular Organization*. [Online] [Datum: 23. 3. 2017.] Dostupné z: http://www.notesonzoology.com/wp-content/uploads/2016/07/clip_image010-25.jpg.
9. **Brooks N. J.** Pressure effects on lipids and bio-membrane assemblies. *IUCrJ*. roč. 1, 2014, s. 470-477.
10. **Cullis P. R., De Kruijff B.** Lipid polymorphism and the functional roles of lipids in biological membranes. *Biochim. Biophys. Acta*. roč. 559, 1979, s. 399-420.
11. **Hrazdira I., Mornstein V., Škopíková J.** *Základy biofyziky a zdravotnické techniky*. 1. vyd. Brno : Neptun, 2006. s. 126-130. ISBN 80-86850-01-3.
12. **Rosina J., Vránová J., Kolářová H. a kol.** *Biofyzika*. 1. vyd. Praha : Grada Publishing, 2013. s. 91-94. ISBN 978-80-247-4237-3.
13. **Navrátil L., Rosina J., Tomáš B. a kol.** *Lékařská biofyzika*. 1. vyd. Praha : MANUS, 2000. s. 102,103. ISBN 80-902318-5-3.
14. **Anonymous.** *Akční potenciál*. [Online] [Datum: 9. 3. 2017.] Dostupné z: <http://www1.lf1.cuni.cz/~zfisar/bp/1.6.old.htm>.
15. **Orel M.** *Základy stavby a funkce smyslových orgánů*. [Online] [Datum: 12. 4. 2017.] Dostupné z: <http://pfyziolfup.upol.cz/castwiki/?p=1120>.
16. **Kodíček M.** *řetězec dýchací*. [Online] [Datum: 23. 3. 2017.] Dostupné z: http://147.33.74.135/knihy/uid_es-002_v1/hesla/retezec_dychaci.html.

17. **Závodská R.** *Biologie buněk*. 1. vyd. Praha : SCIENTIA, 2006. s. 71. ISBN 80-86960-15.
18. **Vajner L., Uhlík J., Konrádová V. a kol.** *Lékařská histologie I : cytologie a obecná histologie*. 1. vyd. Praha : Karolinum, 2010. s. 7-33. ISBN 978-80-246-1860-9.
19. **Beneš J., Kyplová J., Vítek F. a kol.** *Základy fyziky pro lékařské a zdravotnické obory*. 1. vyd. Praha : Grada Publishing, 2015. s. 47, 52, 77. ISBN 978-80-247-4712-5.
20. **Langmeier M., Kittnar O., Marešová D. a kol.** *Základy lékařské fyziologie*. 1. vyd. Praha : Grada Publishing, 2009. s. 25. ISBN 978-80-247-2526-0.
21. **Anonymous.** *Active transport cells*. [Online] [Datum: 10. 3. 2017.] Dostupné z: <http://www.tutorvista.com/biology/active-transport-cells>.
22. **OpenStax College.** *The cell membrane*. [Online] [Datum: 23. 3. 2017.] Dostupné z: <https://courses.lumenlearning.com/ap1/chapter/the-cell-membrane/>.
23. **Taiz R., Zeiger E., Møller I. M. a kol.** *SNAREs, Rab, and Coat Proteins Mediate Vesicle Formation, Fission, and Fusion*. [Online] [Datum: 10. 3. 2017.] Dostupné z: <http://6e.plantphys.net/topic01.06.html>.
24. **Li M., Liu L., Xi N. a kol.** Nanoscale monitoring of drug actions on cell membrane using atomic force microscopy. *Acta Pharmacol Sin.* roč. 36, 2015, s. 769-782.
25. **Fantner G. E., Barbero R. J., Gray D. S. a kol.** Kinetics of antimicrobial peptide activity measured on individual bacterial cells using high-speed atomic force microscopy. *Nat Nanotechnol.* roč. 5, 2010, s. 280-285.
26. **Li M., Liu L., Xi N. a kol.** Atomic force microscopy imaging of live mammalian cells. *Sci China Life Sci.* roč. 56, 2013, s. 811-817.
27. **Liu L., Scheuring S.** Investigation of photosynthetic membrane structure using atomic force microscopy. *Trends Plant Sci.* roč. 18, 2013, s. 277-286.
28. **Dufrêne Y. F., Martínez-Martín D., Medalsy I. a kol.** Multiparametric imaging of biological systems by force-distance curve-based AFM. *Nat Methods.* roč. 10, 2013, s. 847-854.
29. **Kodera N., Yamamoto D., Ishikawa R. a kol.** Video imaging of walking myosin V by high-speed atomic force microscopy. *Nature.* roč. 468, 2010, s. 72-76.
30. **Kasas S., Longo G., Dietler G.** Mechanical properties of biological specimens explored by atomic force microscopy. *J. Phys. D: Appl. Phys.* roč. 46, 2013, s. 1-12.
31. **Hinterdorfer P., Dufrêne Y. F.** Detection and localization of single molecule recognition events using atomic force microscopy. *Nat Methods.* roč. 3, 2006, s. 347-355.
32. **Mari S. A., Pessoa J., Altieri S. a kol.** Gating of the MlotiK1 potassium channel involves large rearrangements of the cyclic nucleotide-binding domains. *Proc Natl Acad Sci U S A.* roč. 108, 2011, s. 20802-20807.

33. **Ingólfsson H. I., Arnarez C., Periole X. a kol.** Computational 'microscopy' of cellular membranes. *Journal of Cell Science*. roč. 129, 2016, s. 257- 268.
34. **Ingólfsson H. I., Lopez C. A., Uusitalo J. J. a kol.** The power of coarse graining in biomolecular simulations. *WIREs Comput Mol Sci*. roč. 4, 2014, s. 225-248.
35. **Vogel A., Feller S. E.** Headgroup conformations of phospholipids from molecular dynamics simulation: sampling challenges and comparison to experiment. *J Membr Biol*. 245, 2012, s. 23-28.
36. **Arnarez C., Marrink S. J., Periole X.** Identification of cardiolipin binding sites on cytochrome c oxidase at the entrance of proton channels. *Sci Rep*. roč. 3, 2013, s. 1-8.
37. **Bangham A. D., Horne R. W.** Negative staining of phospholipids and their structural modification by surface-active agents as observed in the electron microscope. *J Mol Biol*. roč. 8, 1964, s. 660-668.
38. **Safinya C. R., Ewert K. K.** Materials chemistry: Liposomes derived from molecular vases. *Nature*. roč. 489, 2012, s. 372-374.
39. **Cuco A., Serro A. P., Farinha J. P. a kol.** Interaction of the Alzheimer A β (25-35) peptide segment with model membranes. *Colloids Surf B Biointerfaces*. roč. 141, 2016, s. 10-18.
40. **Rädler J. O., Koltover I., Salditt T. a kol.** Structure of DNA-cationic liposome complexes: DNA intercalation in multilamellar membranes in distinct interhelical packing regimes. *Science*. roč. 275, 1997, s. 810-814.
41. **Kubitschke J., Javor S., Rebek J. Jr.** Deep cavitand vesicles – multicompartamental hosts. *Chem. Commun*. roč 48, 2012, s. 9251-9253.
42. **Choi H., Lee D. S.** Illuminating the physiology of extracellular vesicles. *Stem Cell Research & Therapy*. roč. 7, 2016, s. 1-7.
43. **van Dommelen S. M., Vader P., Lakhal S. a kol.** Microvesicles and exosomes: opportunities for cell-derived membrane vesicles in drug delivery. *J Control Release*. roč. 161, 2012, s. 635-644.
44. **Saunderson S. C., Dunn A. C., Crocker P. R. a kol.** CD169 mediates the capture of exosomes in spleen and lymph node. *Blood*. roč. 123, 2014, s. 208-216.
45. **Lee Y., El Andaloussi S., Wood M. J.** Exosomes and microvesicles: extracellular vesicles for genetic information transfer and gene therapy. *Hum Mol Genet*. roč. 21, 2012, s. 125-134.
46. **Kosaka N., Izumi H., Sekine K. a kol.** microRNA as a new immune-regulatory agent in breast milk. *Silence*. roč. 1, 2010, s. 1-8.
47. **Wysoczynski M., Ratajczak M.Z.** Lung cancer secreted microvesicles: underappreciated modulators of microenvironment in expanding tumors. *Int. J. Cancer*. roč. 125, 2009, s. 1595-1603.

48. **Alvarez-Erviti L., Seow Y., Schapira A. H. a kol.** Lysosomal dysfunction increases exosome-mediated alpha-synuclein release and transmission. *Neurobiol. Dis.* roč. 42, 2011, s. 360-367.
49. **Jang Y. Y., Collector M. I., Baylin S. B. a kol.** Hematopoietic stem cells convert into liver cells within days without fusion. *Nat. Cell Biol.* roč. 6, 2004, s. 532-539.
50. **Würdinger T., Tannous B. A., Saydam O. a kol.** miR-296 regulates growth factor receptor overexpression in angiogenic endothelial cells. *Cancer Cell.* roč. 14, 2008, s. 382-393.
51. **Cantaluppi V., Gatti S., Medica D. a kol.** Microvesicles derived from endothelial progenitor cells protected the kidney from ischemia-reperfusion injury by microRNA-dependent reprogramming of resident renal cells. *Kidney Int.* roč. 82, 2012, s. 412-427.
52. **Vickers K. C., Remaley A. T.** Lipid-based carriers of microRNAs and intercellular communication. *Curr. Opin. Lipidol.* roč. 23, 2012, s. 91-97.
53. **Kirsch S. A., Böckmann R. A.** Membrane pore formation in atomistic and coarse-grained simulations. *Biochim. Biophys. Acta.* roč. 1858, 2016, s. 2266-2277.
54. **Belehradek M., Domenge C., Luboinski B. a kol.** Electrochemotherapy, a new antitumor treatment. First clinical phase I-II trial. *Cancer.* roč. 72, 1993, s. 3694-3700.
55. **Mihajlovic M., Lazaridis T.** Antimicrobial peptides in toroidal and cylindrical pores. *Biochim. Biophys. Acta.* roč. 1798, 2010, s. 1485-1493.
56. **Sengupta D., Leontiadou H., Mark A. E. a kol.** Toroidal pores formed by antimicrobial peptides show significant disorder. *Biochim. Biophys. Acta.* roč. 1778, 2008, s. 2308-2317.
57. **Sun D., Forsman J., Woodward C. E.** Multistep molecular dynamics simulations identify the highly cooperative activity of melittin in recognizing and stabilizing membrane pores. *Langmuir.* roč. 31, 2015, s. 9388-9401.
58. **Lis M., Wizert A., Przybylo M. a kol.** The effect of lipid oxidation on water permeability of phospholipids bilayers. *Phys. Chem. Chem. Phys.* roč. 13, 2011, s. 17555-17563.
59. **D'Souza G. G., Weissig V.** Subcellular targeting: a new frontier for drug-loaded pharmaceutical nanocarriers and the concept of the magic bullet. *Expert Opin. Drug Deliv.* roč. 6, 2009, s. 1135-1148.
60. **Rajendran L., Knölker H. J., Simons K.** Subcellular targeting strategies for drug design and delivery. *Nat. Rev. Drug Discov.* roč. 9, 2010, s. 29-42.
61. **Bareford L. M., Swaan P. W.** Endocytic mechanisms for targeted drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* roč. 59, 2007, s. 748-758.
62. **Hoyer J., Neundorff I.** Peptide vectors for the nonviral delivery of nucleic acids. *Acc. Chem. Res.* roč. 45, 2012, s. 1048-1056.

63. **Rosenkranz A. A., Ulasov A. V., Slastnikova T. A. a kol.** Use of intracellular transport processes for targeted drug delivery into a specified cellular compartment. *Biochemistry (Mosc.)*. roč. 79, 2014, s. 928-946.
64. **Byrne J. D., Betancourt T., Brannon-Peppas L.** Active targeting schemes for nanoparticle systems in cancer therapeutics. *Adv. Drug Deliv. Rev.* roč. 60, 2008, s. 1615-1626.
65. **Muro S.** Challenges in design and characterization of ligand-targeted drug delivery systems. *J. Control Release*. roč. 164, 2012, s. 125-137.
66. **Koshkaryev A., Thekkedath R., Pagano C. a kol.** Targeting of lysosomes by liposomes modified with octadecyl-rhodamine B. *J. Drug Target.* roč. 19, 2011, s. 606-614.
67. **Mukhopadhyay S., Linstedt A. D.** Retrograde trafficking of AB5 toxins: mechanisms to therapeutics. *J. Mol. Med. (Berl.)*. roč. 91, 2013, s. 1131-1141.
68. **Elleder M., Sikora J.** Biologie buňky (výukový text). [Online] [Datum: 15. 4. 2017.] Dostupné z: www1.lf1.cuni.cz/udmp/web2/cell/biolbuncz.htm#3.1.1.3.
69. **Johannes L., Römer W.** Shiga toxins- from cell biology to biomedical applications. *Nat. Rev. Microbiol.* roč. 8, 2010, s. 105-116.
70. **FitzGerald D. J., Padmanabhan R., Pastan I. a kol.** Adenovirus-induced release of epidermal growth factor and pseudomonas toxin into the cytosol of KB cells during receptor-mediated endocytosis. *Cell*. roč. 32, 1983, s. 607-617.
71. **Egawa J., Pearn M. L., Lemkuil B. P. a kol.** Membrane lipid rafts and neurobiology: age-related changes in membrane lipids and loss of neuronal function. *J Physiol*. roč. 594, 2016, s. 4565-4579.
72. **Diaz-Rohrer B., Levental K. R., Levental I.** Rafting through traffic: Membrane domains in cellular logistics. *Biochim. Biophys. Acta*. roč. 1838, 2014, s. 3003-3013.
73. **Fiedler K., Kobayashi T., Kurzchalia T.V. a kol.** Glycosphingolipid-enriched, detergent-insoluble complexes in protein sorting in epithelial cells. *Biochemistry*. roč. 32, 1993, s. 6365-6373.
74. **Simons K., Ikonen E.** Functional rafts in cell membranes. *Nature*. roč. 387, 1997, s. 569-572.
75. **Yankner B. A., Lu T.** Amyloid beta-protein toxicity and the pathogenesis of Alzheimer disease. *J. Biol. Chem.* roč. 284, 2009, s. 4755-4759.
76. **Eckert G. P., Wood W. G., Müller W. E.** Lipid membranes and β -amyloid: a harmful connection. *Curr. Protein Pept. Sci.* roč. 11, 2010, s. 319-325.
77. **Mason R. P., Estermyer J. D., Kelly J. F. a kol.** Alzheimer's disease amyloid beta peptide 25-35 is localized in the membrane hydrocarbon core: X-ray diffraction analysis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* roč. 222, 1996, s. 78-82.

78. **Qiang W., Yau W. M., Schulte J.** Fibrillation of β amyloid peptides in the presence of phospholipid bilayer and the consequent membrane disruption. *Biochim. Biophys Acta*. roč. 1848, 2015, s. 266-276.
79. **Barrett P. J., Song Y., Van Horn W. D. a kol.** The amyloid precursor protein has a flexible transmembrane domain and binds cholesterol. *Science*. roč. 336, 2012, s. 1168-1171.
80. **Lau T. L., Ambroggio E. E., Tew D. J. a kol.** Amyloid-beta peptide disruption of lipid membranes and the effect of metal ions. *J. Mol. Biol.* roč. 356, 2006, s. 759-770.
81. **Ghio S., Kamp F., Cauchi R. a kol.** Interaction of α -synuclein with biomembranes in Parkinson's disease- role of cardiolipin. *Prog. Lipid Res.* roč. 61, 2016, s. 73-82.
82. **Klingenberg M.** Cardiolipin and mitochondrial carriers. *Biochim. Biophys. Acta*. roč. 1788, 2009, s. 2048-2058.